



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



## THESE

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Lorraine**

**Spécialité : Chimie**

Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés (LRGP)  
Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire (LCPM)  
Ecole Doctorale RP2E

Présentée et soutenue publiquement le 03 décembre 2013

par Aymeric SEVE

*Optimisation de nanoparticules multifonctionnelles pour une  
amélioration de l'efficacité photodynamique, de la  
sélectivité tumorale et de la détection par IRM.*

**Rapporteurs :**

Vincent SOL, Professeur, Université de Limoges  
Jean-Olivier DURAND, Chargé de Recherche CNRS, Université Montpellier II

**Examineurs :**

Muriel BARBERI-HEYOB, Professeur, Université de Lorraine  
Serge MORDON, Directeur de Recherche, INSERM, Professeur, Université Lille II

**Directeur et co-Directeur de thèse :**

Céline FROCHOT, Directeur de Recherche CNRS, Université de Lorraine  
Régis VANDERESSE, Chargé de Recherche CNRS, Université de Lorraine

**Membre invité :**

François LUX, Maître de conférences, Université Claude-Bernard Lyon I

Année 2013



*Papa,  
Maman,*





# Remerciements

Céline Frochot, je te remercie de m'avoir encadré et conseillé durant ces trois années. Un grand merci également pour ton soutien et ta confiance tout au long de cette thèse.

Régis Vanderesse, je te remercie de m'avoir guidé dans ce périple. J'ai aimé les nombreuses discussions que nous avons eues ensemble. Un très grand merci pour tout ce que tu m'as appris et pour les corrections de ce manuscrit.

Francis Baros, merci pour ton dévouement, tes conseils et ton aide précieuse.

Merci également à Philippe Arnoux pour ton soutien logistique durant ces trois ans.

Je remercie l'ensemble des membres du Jury : le Professeur Vincent Sol, le Docteur Jean-Olivier Durand pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que le Professeur Serge Mordon et le Professeur Muriel Barberi-Heyob pour leur participation à ce jury. Merci également à François Lux d'avoir accepté d'assister à ma soutenance de thèse.

Un grand merci également à toute l'équipe Biopromo pour les agréables moments d'échanges scientifiques et pour leur sympathie. Un merci tout particulier à Khalil et Aurélie, pour leur amitié, pour leur disponibilité, leur soutien et pour m'avoir aidé dans divers domaines.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du LRGP, surtout Fiflo et au Chauval de l'apocalypse (parce que « un Chauval, des Chauveaux » enfin, « un ou deux ») qui par leur aide ou simplement leur amitié ont contribué à la réalisation de ce travail. Un grand merci à Jean-Claude André pour son aide, sa bonne humeur et surtout pour ses rillettes maison.

Merci à toute l'équipe du CRAN pour m'avoir aidé avec les tests biologiques, particulièrement Hamanou qui a passé de nombreuses heures à tester mes échantillons.

J'adresse aussi mes remerciements aux membres du LCPM pour leur chaleureux accueil, en particulier Mathilde Achard et Olivier Fabre.

Mes remerciements vont également Cercle Nancéen de Judo et à l'OFPNJ Judo. Grâce à vous j'ai pu m'évader et les moments de détente que j'ai pu partager avec vous ont été des bouffées d'oxygène. Vous m'avez permis de réaliser plus que je n'aurais pu espérer et ce que j'ai appris à vos côtés me suivra, je pense, jusqu'à mon dernier souffle. J'espère et je souhaite continuer ce que j'ai commencé.

Enfin, je tiens à dédier ce travail à ma famille, tout particulièrement à mes parents, sans lesquels je n'en serai pas là aujourd'hui mais cela serait trop long à expliquer. Je vous remercie pour votre soutien et vos encouragements durant toutes ces années.



# *Table des matières*



# Table des matières

REMERCIEMENTS .....	5
TABLE DES MATIERES .....	9
TABLE DES EQUIPES REUNIES POUR CE TRAVAIL .....	11
LISTE DE TABLEAUX .....	13
TABLE DES EQUATIONS .....	15
TABLE DES FIGURES.....	17
ABREVIATIONS .....	25
I. INTRODUCTION GENERALE.....	33
I. 1. CONTEXTE GENERAL.....	35
I. 1. a. Histoire du cancer et les premiers traitements .....	35
I. 1. b. Qu'est ce que le cancer ?.....	38
I. 1. c. Les facteurs favorisant l'apparition des cancers .....	39
I. 1. c. i. Les facteurs aggravants ou facteurs subis .....	39
I. 1. c. ii. Les facteurs de risques comportementaux.....	39
I. 1. d. Classification des cancers.....	41
I. 1. d. i. Les familles de cancers .....	41
I. 1. d. ii. Les glioblastomes .....	42
I. 1. e. Les traitements.....	42
I. 2. LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE OU PDT .....	44
I. 2. a. Historique.....	44
I. 2. a. i. Les prémices de la PDT : la photochimiothérapie .....	44
I. 2. a. ii. Les molécules naturelles tétrapyrroliques (la chlorophylle et ses dérivés) .....	53
I. 3. ETAT DE L'ART DE LA PDT .....	57
I. 3. a. Principes généraux.....	57
I. 3. a. i. Les principes photophysiques de la PDT .....	57
I. 3. a. ii. L'oxygène singulet .....	59
I. 3. b. Les propriétés photophysiques d'un bon photosensibilisateur .....	63
I. 4. LES 4 GÉNÉRATIONS DE PHOTOSENSIBILISATEURS .....	66
I. 4. a. Première génération .....	66
I. 4. b. Deuxième génération.....	67
I. 4. b. i. La structure chimique.....	67
I. 4. b. ii. La nomenclature.....	68
I. 4. b. iii. Les propriétés photophysiques des porphyrines.....	68
I. 4. b. iv. Synthèse des porphyrines .....	70
I. 4. c. Les photosensibilisateurs de deuxième génération utilisés en clinique ou en recherche clinique .....	81
I. 4. d. Photosensibilisateurs de troisième génération .....	84
I. 4. e. Intérêt de l'adressage/vectorisation .....	84
I. 5. LES NANOPARTICULES.....	95
I. 5. a. Généralités .....	95
I. 5. b. Synthèse.....	96
I. 5. c. Les nanoparticules et la PDT.....	98

I. 5. c. i. Les nanoparticules organiques .....	100
I. 5. c. ii. Les nanoparticules inorganiques .....	102
I. 5. d. <i>Les photosensibilisateurs de quatrième génération pour le théranostic</i> .....	139
I. 5. e. <i>L'IRM</i> .....	139
I. 5. e. i. Généralités .....	139
I. 5. e. ii. Ions Gd <sup>3+</sup> et toxicité .....	140
<b>II. VERS UNE NANOPARTICULE IDÉALE .....</b>	<b>145</b>
II. 1. CONTEXTE .....	145
II. 2. PLAN D'EXPÉRIENCE .....	145
II. 2. a. <i>Définition</i> .....	146
II. 2. b. <i>Principe</i> .....	146
II. 2. c. <i>Application de cette approche</i> .....	147
II. 2. c. i. Les nanoparticules : paramètres modifiés .....	148
II. 2. c. ii. Le photosensibilisateur .....	152
II. 2. c. iii. Caractérisations photophysiques des photosensibilisateurs .....	154
II. 2. c. iv. Influence de la concentration en photosensibilisateur sur les propriétés photophysiques des nanoparticules .....	161
II. 2. c. v. Le peptide .....	171
II. 2. c. vi. Synthèse des différents lots du plan d'expérience .....	176
II. 3. RÉSULTATS DU PLAN D'EXPÉRIENCES .....	179
II. 3. a. <i>Propriétés photophysiques des nanoparticules</i> .....	179
II. 3. a. i. Analyse des résultats .....	192
II. 3. a. ii. Les premiers tests biologiques .....	197
II. 3. a. iii. Perspectives .....	239
<b>III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>243</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>245</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>259</b>

## Table des équipes réunies pour ce travail

Laboratoire	Equipe	Personnes	Rôle	Parutions
<b>LRGP</b> <b>Nancy</b> (UMR 7274)	BioPromo	Céline Frochot (D.R) Jean-Claude André (D.R) Francis Baros (C.R) Philippe Arnoux (I.E) Aurélie Stallivieri (Thésarde) Khalil Zaghdoudi (Thésard) Pierre Couleaud (Thésard) Albert Moussaron (Post-Doctorant) Rima Chouikrat (Thésarde)	Synthèse des photosensibilisateurs  Etudes photophysiques	Benachour et al. (2012) <sup>[1]</sup>  Benachour et al. (2012) <sup>[2]</sup>  Chouikrat et al. (2012) <sup>[3]</sup>
		Régis Vanderesse (C.R) Mathilde Achard (Technicienne)	Synthèses peptidiques	Sève et al. (2012) <sup>[4]</sup>
		Muriel Barberi-Heyob (Pr) Hamanou Benachour (Post Doctorant) Magali Toussaint (Thésarde)	Etudes biologiques	Frochot et al. (2013) (sous presse)
<b>LCMPL</b> <b>Lyon</b> (UMR 5620)	FENNEC	Olivier Tillement (Pr) François Lux (Pr) Alexandra Basset (Post-Doctorante) Charles Truillet (Thésard)	Synthèses de nanoparticules	





# Liste de tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des types de cancers recensés et de leurs proportions d'après les références [10, 14].	41
Tableau 2 : Molécules utilisées pour la destruction de cellules cancéreuses par production d'espèces réactives de l'oxygène, d'après la référence [15].	43
Tableau 3 : Quelques autres types de catalyses utilisées pour la synthèse de porphyrines.	76
Tableau 4: Photosensibilisateurs approuvés au niveau clinique, tiré de la référence [156].	83
Tableau 5 : Taux de cancers présentant une surexpression du NRP-1 en fonction du type de cancer, d'après la référence [251].	91
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différentes techniques de synthèse des nanoparticules, d'après les références [266-268].	97
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différents agents de contraste mis sur le marché, adapté de la référence [114].	141
Tableau 8 : Coefficients d'absorption molaire des la P <sub>1</sub> -COOH dans l'EtOH en fonction des longueurs d'onde d'absorption.	155
Tableau 9 : Coefficients d'absorption molaire de la TPC-COOH dans l'EtOH en fonction des longueurs d'onde d'absorption.	157
Tableau 10 : Coefficients d'absorption molaire des la TPC-NHS dans l'EtOH en fonction des longueurs d'onde d'absorption.	159
Tableau 11 : Rendements quantiques de fluorescence	160
Tableau 12 : Acides aminés utilisés pour synthétiser le peptide ATWLPPR protégé.	173
Tableau 13 : Longueurs d'onde d'absorption et de fluorescence et rendements quantiques des A.A fluorescents dans l'eau, d'après les références [349, 350].	175
Tableau 14 : Caractéristiques de nanoparticules synthétisées dans le plan d'expérience.	177
Tableau 15 : Rendements de fluorescence de la TPC et de luminescence de l' <sup>1</sup> O <sub>2</sub> formé par les lots de nanoparticules, λ <sub>exc.</sub> = 414 nm.	192
Tableau 16 : Rendements de greffage de la chlorine et des peptides sur les nanoparticules du plan d'expérience.	194
Tableau 17 : Rendements de greffage peptidique.	194
Tableau 18 : Rendements de greffage du photosensibilisateur.	195
Tableau 19 : Propriétés photophysiques du photosensibilisateur greffé pour les 5 lots intéressants.	196
Tableau 20 : Propriétés photophysiques du photosensibilisateur greffé pour les 4 lots sans <sup>1</sup> O <sub>2</sub> détecté.	197
Tableau 21 : Tableau des constantes de chélation du DOTA pour certains cations, d'après les références [367, 368].	242
Tableau 22 : Tableau récapitulatif des différents types de liposomes et des méthodes de synthèse permettant de les obtenir, d'après la référence [279].	245
Tableau 23 : Techniques de synthèse des nanotubes de carbone, d'après la référence [283].	248
Tableau 24 : Différentes méthodes de synthèse des nanoparticules de fer, d'après les références [296-298].	250
Tableau 25 : Tableau récapitulatif des rendements quantiques des références utilisées, d'après les références [370-372].	251



# Table des équations

Equation 1 : Equations des réactions photochimiques primaires, d'après les références [86, 122, 126-128].	58
Equation 2 : Equations des réactions photochimiques primaires, d'après les références [126].	58
Equation 3 : Réaction d'excitation d'un photosensibilisateur, d'après les références [86, 122, 129, 130].	59
Equation 4 : Réactions de désexcitation d'un photosensibilisateur depuis son état excité $S_1$ , d'après les références [130].	59
Equation 5 : Réactions de désexcitation d'un photosensibilisateur depuis son état excité $T_1$ , d'après les références [130].	59
Equation 6 : Réactions de transfert d'énergie du photosensibilisateur au dioxygène, d'après les références [130].	59
Equation 7 : Réaction de quenching physique de l'oxygène singulet, d'après la référence [122].	61
Equation 8 : Réaction de quenching chimique de l'oxygène singulet, d'après la référence [122].	61
Equation 9 : Réaction de désexcitation dimoléculaire de l'oxygène singulet, d'après la référence [32].	62
Equation 10 : Réaction de désexcitation monomoléculaire de l'oxygène singulet, d'après la référence [32].	62
Equation 11 : Loi de Beer-Lambert.	66
Equation 12 : Equation reliant la concentration en une molécule en fonction du temps et de sa constante d'élimination, d'après la référence [126].	66
Equation 13 : Réaction de formation de l'oxyde de gadolinium.	148
Equation 14 : Equation de calcul du rendement quantique de fluorescence.	156
Equation 15 : Equation de calcul du rendement quantique de luminescence de $^1O_2$ .	156



# Table des figures

Figure 1 : Schéma d'une nanoparticule.....	34
Figure 2 : Photographie du papyrus de Edwin Smith, d'après la référence [8]. .....	36
Figure 3 : Fémur portant les stigmates d'une tumeur osseuse, d'après la référence [5]. .....	37
Figure 4 : Crâne montrant des destructions osseuses dues à un glioblastome non traité, d'après la référence [5]. .....	37
Figure 5 : Planisphère indiquant le nombre de décès dus aux cancers en 2008 et les prévisions pour 2030, d'après la référence [11].....	40
Figure 6 : Répartition mondiale des cancers, sexes et âges confondus en 2008, adapté de la référence [2]. .....	40
Figure 7 : Carte géographique de la répartition de cancers chez l'homme en France selon les régions en 2011, d'après la référence [13].....	41
Figure 8 : Structure chimique de l'acridine. ....	45
Figure 9 : Structure chimique de l'acridine orange. ....	45
Figure 10 : Structure chimique de l'éosine Y. ....	46
Figure 11 : Structure chimique du mélange d'hématoporphyrines, d'après la référence [5]. .....	46
Figure 12 : Photographies de Meyer-Betz juste après injection (à gauche) et après que les symptômes d'hypersensibilité aient diminués (à droite), d'après la référence [32]. .....	47
Figure 13 : Structure chimique des oligomères de l'hématoporphyrine. ....	48
Figure 14 : Structure chimique de l'éther de dihématoporphyrine (en haut à gauche) et de l'ester de dihématoporphyrine (en bas à droite).....	49
Figure 15 : Spectre d'absorption UV-visible du Photofrin® en solution aqueuse, adapté de la référence [58]. .....	49
Figure 16 : Schéma d'intercalation des psoralènes entre 2 brins d'ADN, adapté de la référence [17]. .....	50
Figure 17 : La Berce du Caucase ou Berce de Mantegazzi ( <i>Heracleum mantegazzianum</i> ), une plante invasive en Europe de l'ouest, d'après la référence [1, 9]. .....	50
Figure 18 : Brûlure photochimique suite au contact avec la Berce du Caucase, d'après la référence [9]. .....	50
Figure 19 : Structure chimique de l'hypéricine, d'après la référence [3]. .....	51
Figure 20 : Schéma botanique de <i>Hypericum perforatum</i> L., d'après la référence [1]. .....	51
Figure 21 : Schéma botanique du curcuma, d'après la référence [1]. .....	51
Figure 22 : Structure chimique de la curcumine forme kéto. ....	51
Figure 23 : Structure chimique de la curcumine forme énol. ....	51
Figure 24 : Structure chimique du bleu de méthylène. ....	52
Figure 25 : Couche épithéliale visualisée à 660 nm vue au microscope électronique après application de bleu de méthylène, d'après la référence [6]. .....	52
Figure 26 : Structure chimique du rose de bengale. ....	52
Figure 27 : Photographie d'une image au microscope électronique d'une <i>Loricifera Spinoloricus</i> marquée au rose de bengale, d'après la référence [89]. .....	52
Figure 28 : Complexe de chlorure de tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II), d'après la référence [91]. .....	53
Figure 29 : Structure chimique de la chlorophylle a. ....	54
Figure 30 : Structure chimique de la chlorophyllide a. ....	54
Figure 31 : Structure chimique de la phéophytine a. ....	55
Figure 32 : Structure chimique de la purpurine-18. ....	55
Figure 33 : Structure chimique du phéophorbide a. ....	56
Figure 34 : Structure chimique de la chlorine e6, d'après la référence [113]. .....	56
Figure 35 : Structure chimique de la bactériochlorophylle a, d'après la référence [116]. .....	57
Figure 36 : Diagramme de Jablonski des transferts énergétiques conduisant à la formation de ROS à partir d'un photosensibilisateur, adapté de la référence [125]. .....	58
Figure 37 : Aurore boréale montrant la fluorescence de l <sup>1</sup> O <sub>2</sub> formé dans la haute atmosphère lors de son interaction avec les vents solaires, d'après la référence [8]. .....	59
Figure 38 : Spectre électronique de l'ozone et de ses produits de photodissociation générés suivant différentes bandes d'excitation, adapté des références [125, 131]. .....	59
Figure 39 : Diagramme des orbitales moléculaires du dioxygène, adapté de la référence [127]. .....	60
Figure 40 : Courbes des énergies potentielles des électrons de l'oxygène en fonction de l'état énergétique de la molécule, adapté de la référence [86]. .....	61
Figure 41 : Mécanisme de Rotomskis de photo-oxydation de l'hématoporphyrine en présence de l <sup>1</sup> O <sub>2</sub> , adapté de la référence [101]. .....	62
Figure 42 : Schémas des étapes des mécanismes de la nécrose et de l'apoptose cellulaire, adapté des références [154, 155]. .....	63
Figure 43 : Profondeur de pénétration de la lumière suivant sa longueur d'onde, adapté de la référence [156]. .....	64
Figure 44 : Spectre d'absorption des composants majoritaires des tissus vivants en fonction de la longueur d'onde d'absorption et du composant considéré, adapté des références [126, 160]. .....	64

Figure 45 : Domaines d'absorption UV-visible de différentes molécules endogènes et les sources d'excitation correspondantes, adapté de la référence [125].	65
Figure 46 : Spectres d'absorption de différents photosensibilisateurs en comparaison de la transmittance des tissus vivants. Les bandes de Soret, Q <sub>I</sub> , Q <sub>II</sub> , Q <sub>III</sub> et Q <sub>IV</sub> sont celles de la porphyrine. La courbe de transmittance a été obtenue avec un morceau de scrotum (7 mm d'épaisseur), adapté de la référence [86].	65
Figure 47 : Structures chimiques des squelettes de quatre composés porphyriniques.	67
Figure 48 : Schéma indiquant la taille du cycle porphyrinique, adapté de la référence [32].	67
Figure 49 : Nomenclature du macrocycle avec la numérotation de Fischer (à gauche) et la numérotation IUPAC (à droite), d'après les références [163-165].	68
Figure 50 : Spectres d'absorption UV-visible caractéristiques des différents types de porphyrines, adapté de la référence [165].	69
Figure 51 : Spectres d'absorption UV-visible d'une porphyrine (5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl-21,23-porphyrine) et de ses formes bactériochlorine et chlorine dans l'EtOH.	70
Figure 52 : Echelle des coefficients d'absorption maximum de différents photosensibilisateurs en fonction de leur longueur d'onde d'absorption UV-visible utile en PDT, adaptée de la référence [169].	70
Figure 53 : Réaction de la synthèse de la TPP effectuée par Rothemund, adaptée de la référence [164].	71
Figure 54 : Schéma de synthèse d'une tétraarylporphyrine suivant la méthode de Alder, adapté de la référence [175].	72
Figure 55 : Synthèse d'une porphyrine <i>méso</i> -tétrasubstituée par la méthode des « aldéhydes mixtes » catalysée à l'acide propionique, d'après la référence [179].	73
Figure 56 : Réaction de synthèse d'une porphyrine par la méthode des "aldéhydes mixtes", adapté de la référence [34].	73
Figure 57 : Synthèse d'une porphyrine tétra- <i>méso</i> -substituée suivant la méthode de Lindsey, d'après la référence [34].	74
Figure 58 : Synthèse sur phase solide d'une porphyrine monohydroxysubstituée, adaptée des références [34, 183].	75
Figure 59 : Synthèse d'une porphyrine à partir d'une méthode de synthèse de pyrrole-carbinol.	75
Figure 60 : Réaction de synthèse d'un dipyrrométhane, adapté de la référence [173].	76
Figure 61 : Schéma de synthèse de Woodward et MacDonald, adapté de la référence [171].	77
Figure 62 : Schéma de la synthèse de Ogoshi, adapté de la référence [173].	77
Figure 63 : Schéma de la synthèse d'une porphyrine <i>méso</i> -substituée par l'intermédiaire de la réaction de Suzuki, adapté de la référence [196].	78
Figure 64 : Formation d'un dipyrrométhène à partir d'un dipyrrométhane, d'après la référence [173].	78
Figure 65 : Structures chimiques des dipyrrométhènes couramment utilisés pour la synthèse de macrocycles, adapté de la référence [173].	79
Figure 66 : Synthèse d'un dipyrrométhène par l'oxydation du dipyrrométhane correspondant, d'après la référence [197].	79
Figure 67 : Schéma de la synthèse d'une porphyrine par la méthode "3+1", d'après la référence [167].	79
Figure 68 : Schéma de la réaction de synthèse d'une porphyrine à partir de bilanes, adapté de la référence [173].	80
Figure 69 : Réaction de l'étape de synthèse d'une bactériochlorine, d'après la référence [199].	80
Figure 70 : Réaction de l'étape de synthèse d'une chlorine d'après la référence [199].	81
Figure 71 : Structure chimique de la <i>m</i> -THPC.	81
Figure 72 : Spectre d'absorption UV-visible de la <i>m</i> -THPC dans la DMF.	81
Figure 73 : Structure chimique de l'ALA et de ses dérivés (R = H : ALA, R = CH <sub>3</sub> : méthyl-ALA, R = C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> : hémé-ALA).	82
Figure 74 : Structure chimique de la PpIX.	82
Figure 75 : Spectre d'absorption UV-visible de la PpIX dans le DMSO, adapté de la référence [204].	82
Figure 76 : Schéma de synthèse biologique de la protoporphyrine IX, adapté de la référence [202].	82
Figure 77 : Structure chimique de la Verteporfin.	83
Figure 78 : Spectre d'absorption UV-visible de la Verteporfin dans l'eau, adapté de la référence [205].	83
Figure 79 : Structure chimique d'un composé porphyrine-œstradiol, d'après la référence [215].	85
Figure 80 : Structure chimique des conjugués « <i>m</i> -THPC-like » - acide folique synthétisés par Julien Gravier.	86
Figure 81 : Structure chimique d'une porphyrine couplée à des sucres, adapté de la référence [209].	87
Figure 82 : Schéma de synthèse d'une tétraphénylporphyrine glycosylée, adapté de la référence [225].	87
Figure 83 : Formule développée de deux conjugués porphyrine-polyamines, adapté de la référence [236].	88
Figure 84 : Les différentes étapes de l'angiogénèse, adapté de la référence [239].	89
Figure 85 : Schéma synthétique des principaux effecteurs biologiques opérant au niveau de la cellule endothéliale lors de l'angiogénèse tumorale.	90
Figure 86 : Schéma du récepteur NRP-1, adapté de la référence [255].	92
Figure 87 : Diagramme en ruban de la NRP-1 montrant la topologie et l'organisation de son ectodomaine, adapté de la référence [251].	92
Figure 88 : Structure chimique du peptide ATWLPPR déprotégé, d'après la référence [245].	94
Figure 89 : Structure chimique de la molécule TPC-AHX-ATWLPPR, adapté de la référence [245].	94
Figure 90 : Représentation schématique du ciblage tumoral avec des nanoparticules par l'intermédiaire de l'effet EPR, adapté de la référence [261].	95
Figure 91 : Echelle relative de tailles des nanoparticules, adaptée de la référence [125].	96
Figure 92 : Schémas des différents types de nanoparticules existantes, d'après la référence [3].	98

Figure 93 : Schémas d'encapsulation d'un photosensibilisateur dans des micelles. ....	100
Figure 94 : Schéma d'une molécule lipidique (A), d'un liposome unilamellaire (B) et d'un liposome multilamellaire (C).....	101
Figure 95 : Structure chimique de quatre structures de carbones : A. Graphite ; B. SWCNT ( <i>single-walled carbon nanotube</i> ) ; C. Fullerène ; D. Diamant. ....	102
Figure 96 : Modélisation de deux nanotubes de carbone : SWCNT (à gauche) et MWCNT (à droite), adapté de la référence [284].....	102
Figure 97 : Schéma des niveaux électroniques possibles dans les QD et dans les semi-conducteurs massifs, adapté de la référence [290]. ....	103
Figure 98 : A. Photographie de la fluorescence de QD suivant leurs tailles sous excitation UVB ; B. Spectre de fluorescence des différents QD ; C. Spectres d'absorption des QD selon leur taille, adaptés de [293].....	103
Figure 99 : Mécanismes de transferts d'énergie associés au QD suite à une excitation dans le domaine du visible, adapté de la référence [290]. ....	104
Figure 100 : Mécanismes de transfert d'énergie s'opérant après excitation d'un QD avec un rayonnement de très haute énergie, adapté de la référence [290]. ....	104
Figure 101 : Schémas des différents types de nanoparticules, d'après la référence [305]. ....	106
Figure 102 : Schéma de la résonance électronique de plasmon de surface, adapté de la référence [309].....	106
Figure 103 : Diagramme des niveaux d'énergie d'un système $Gd^{3+} - Eu^{3+}$ montrant la possibilité du « <i>Quantum Cutting</i> », d'après la référence [317]. ....	108
Figure 104 : Spectres d'émission de nanoparticules $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ (2%) (à gauche) et $Gd_2O_3:Tb^{3+}$ (2%) (à droite) excitées à 336 nm, adapté de la référence [321]. ....	108
Figure 105 : Diagramme des niveaux d'énergie lors de l'émission par <i>up-conversion</i> de nanoparticules $Gd_2O_3: Er^{3+}, Yb^{3+}$ excitées à 980 nm, d'après la référence [326]. ....	110
Figure 106 : Spectre d'émission de nanoparticules dopées en fonction de la concentration en $Eu^{3+}$ , adapté de la référence [311]. ....	110
Figure 107 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse-condensation de précurseurs de silice en catalyse basique, d'après la référence [175]. ....	112
Figure 108 : Photographie TEM des nanoparticules de silice obtenues par catalyse basique, d'après la référence [54].....	112
Figure 109 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse-condensation de précurseurs de silice en catalyse acide, d'après la référence [175]. ....	112
Figure 110 : Photographie TEM des nanoparticules de silice obtenues par catalyse acide, d'après la référence [54].....	112
Figure 111 : Schéma d'un chélate pour l'imagerie IRM et des différentes constantes associées, d'après la référence [332]. ....	140
Figure 112 : Schéma de l'interconnexion des trois fonctionnalités prises en compte pour l'élaboration du plan d'expérience. ....	145
Figure 113 : Représentations de plans d'expérience factoriels complets et fractionnaires, adapté de la référence [333]. ....	147
Figure 114 : Graphiques des distributions de tailles en volume, obtenues par la méthode DLS ( <i>Dynamic Light Scattering</i> ) ( $\lambda_{exc.} = 633$ nm) des GC et des PC dans le DEG, adapté de la référence [333]. La courbe rouge correspond aux PC et celle en vert correspond aux GC, dans le diéthylène glycol (DEG).....	148
Figure 115 : Structure chimique du (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES). ....	149
Figure 116 : Structure chimique du tétraéthoxysilane (TEOS). ....	149
Figure 117 : Réaction d'hydrolyse du TEOS. ....	149
Figure 118 : Réaction de condensation du TEOS et du produit d'hydrolyse du TEOS, d'après les références [339, 341].....	149
Figure 119 : Structure chimique du DTPA. ....	150
Figure 120 : Structure chimique du DOTA.....	150
Figure 121 : Structure chimique du DOTAREM®, avec une molécule d'eau dans la sphère de coordination du gadolinium. ....	150
Figure 122 : Structure chimique du Magnevist®, avec une molécule d'eau dans la sphère de coordination du gadolinium. ....	150
Figure 123 : Structure chimique du DTPA-BA.....	151
Figure 124 : Structure chimique du DOTA-GA.....	151
Figure 125 : Schéma de fonctionnalisation d'une nanoparticule avec le DOTA-GA. ....	151
Figure 126 : Réaction de synthèse de la $P_1$ -COOH.....	152
Figure 127 : Schéma de synthèse de la TPC-COOH à partir de la $P_1$ -COOH. ....	153
Figure 128 : Structures chimiques des deux isomères de la TPC-COOH.....	154
Figure 129 : Schéma réactionnel de synthèse de la TPC-NHS. ....	154
Figure 130 : Spectre d'absorption UV-visible de la $P_1$ -COOH dans l'EtOH. ....	155
Figure 131 : Spectre d'émission de fluorescence de la $P_1$ -COOH dans l'EtOH, excitée à 414 nm. ....	155
Figure 132 : Spectre d'émission de luminescence de $l^1O_2$ dans l'EtOH après excitation de la $P_1$ -COOH à 414 nm. ....	156
Figure 133 : Spectre d'absorption UV-visible de la TPC-COOH dans l'EtOH. ....	157
Figure 134 : Spectre de fluorescence de la TPC-COOH dans l'EtOH, excitée à 414 nm. ....	158
Figure 135 : Spectre de luminescence de l'oxygène singulet formé suite à l'excitation de la TPC-COOH à 414 nm.....	158
Figure 136 : Spectre d'absorption UV-visible de la TPC-NHS dans l'EtOH, $Do_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ . ....	159
Figure 137 : Spectre de fluorescence de la TPC-NHS dans l'EtOH, excitée à 414 nm. ....	159
Figure 138 : Spectre de luminescence de $l^1O_2$ formé après l'excitation à 414 nm de la TPC-NHS ( $Do_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ ). ....	160
Figure 139 : Représentation de Fisher, d'après la référence [346]. ....	171
Figure 140 : Représentation de Cram, d'après la référence [346].....	171
Figure 141 : Structure tridimensionnelle du peptide ligand ATWLPPR dessinée sous Chem3D.....	172



Figure 142 : Structure tridimensionnelle du peptide <i>scrambled</i> LWRPTPA dessinée sous Chem3D. ....	172
Figure 143 : Structure chimique du groupement protecteur Fmoc lié à un acide aminé. ....	172
Figure 144 : Structure chimique de la résine « <i>chlorotriyl chloride</i> », adaptée de la référence [18]. ....	172
Figure 145 : Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés, par activation au HBTU. ....	174
Figure 146 : Schéma récapitulatif de la synthèse et du clivage du peptide ATWLPPR protégé. ....	174
Figure 147 : Structure chimique du peptide ATWLPPR protégé (le tryptophane est indiqué en orange). ....	175
Figure 148 : Structure chimique du peptide LWRPTPA protégé (le tryptophane est indiqué en orange). ....	175
Figure 149 : Spectres de fluorescence du peptide ATWLPPR sous sa forme protégée et sous sa forme libre dans l'EtOH, excité à 280 nm. ....	176
Figure 150 : Spectres de fluorescence du peptide LWRPTPA sous sa forme protégée et sous sa forme libre dans l'EtOH, excité à 280 nm. ....	176
Figure 151 : Schéma de la déprotection du peptide ATWLPPR protégé par les fonctions Pbf (violet), Boc (bleu) et tBu (vert). ....	178
Figure 152 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence, $\lambda_{exc} = 414$ nm ; C) Spectres de luminescence de $l^1O_2$ , $\lambda_{exc} = 414$ nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	180
Figure 153 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence, $\lambda_{exc} = 414$ nm ; C) Spectres de luminescence de $l^1O_2$ , $\lambda_{exc} = 414$ nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	181
Figure 154 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	182
Figure 155 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence, $\lambda_{exc} = 414$ nm ; C) Spectres de luminescence de $l^1O_2$ , $\lambda_{exc} = 414$ nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	183
Figure 156 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence, $\lambda_{exc} = 414$ nm ; C) Spectres de luminescence de $l^1O_2$ , $\lambda_{exc} = 414$ nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	184
Figure 157 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence, $\lambda_{exc} = 414$ nm ; C) Spectres de luminescence de $l^1O_2$ , $\lambda_{exc} = 414$ nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	185
Figure 158 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	186
Figure 159 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence, $\lambda_{exc} = 414$ nm ; C) Spectres de luminescence de $l^1O_2$ , $\lambda_{exc} = 414$ nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	187
Figure 160 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence, $\lambda_{exc} = 414$ nm ; C) Spectres de luminescence de $l^1O_2$ , $\lambda_{exc} = 414$ nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	188
Figure 161 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence, $\lambda_{exc} = 414$ nm ; C) Spectres de luminescence de $l^1O_2$ , $\lambda_{exc} = 414$ nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	189
Figure 162 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence, $\lambda_{exc} = 414$ nm ; C) Spectres de luminescence de $l^1O_2$ , $\lambda_{exc} = 414$ nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	190
Figure 163 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence, $\lambda_{exc} = 414$ nm ; C) Spectres de luminescence de $l^1O_2$ , $\lambda_{exc} = 414$ nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide, $\lambda_{exc} = 280$ nm. ....	191
Figure 164 : Schéma théorique d'une SRP. ....	196
Figure 165 : Schémas des nanoparticules du lot 5 et du lot 13. ....	198
Figure 166 : Indice cellulaire normalisé en fonction de la concentration et de la dose lumière obtenu avec le système XCELLigence, adapté de la référence [2]. ....	198
Figure 167 : Indice cellulaire normalisé en fonction de la concentration et de la dose lumière obtenu avec un test WST-1, adapté de la référence [2]. ....	198
Figure 168 : Taux de survie cellulaire en fonction du type et de la concentration en nanoparticules, adapté de la référence [2]. ....	199
Figure 169 : Graphique de l'évolution cellulaire en fonction du temps et de la concentration en nanoparticules, adapté de la référence [2]. ....	199
Figure 170 : Signal de réhaussement IRM obtenu avec les nanoparticules du lot 5, adapté de la référence [2]. ....	199
Figure 171 : Influence des paramètres sur la cytotoxicité. ....	233
Figure 172 : Influence des paramètres de l'interdépendance sur la cytotoxicité. ....	234
Figure 173 : Influence des paramètres sur la phototoxicité. ....	235
Figure 174 : Interdépendance des paramètres sur la phototoxicité. ....	236
Figure 175 : Influence des paramètres sur l'affinité des nanoparticules pour NRP-1. ....	237
Figure 176 : Interdépendance des paramètres sur l'affinité des nanoparticules pour NRP-1. ....	238
Figure 177 : Schéma d'une nanoparticule fonctionnalisée par chimie-click. ....	239
Figure 178 : Structure chimique de la L-azidoalanine-NHS. ....	240
Figure 179 : Schéma réactionnel d'une addition « 3+2 », d'après la référence [364]. ....	241
Figure 180 : Schéma de synthèse du photosensibilisateur avec une fonction alcyne, d'après la référence [365]. ....	241
Figure 181 : Structure chimique du DOTAGA. ....	242
Figure 182 : Structure chimique du DOTAGA fonctionnalisé avec la propargylamine et chélaté avec un ion $Gd^{3+}$ . ....	242
Figure 183 : Structure chimique du cyclen. ....	242
Figure 184 : Un exemple d'agent chélatant qu'il serait possible de synthétiser. ....	242
Figure 185 : Spectre d'absorption UV-visible de la TPP dans le toluène avec $Do_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ . ....	251
Figure 186 : Spectre de fluorescence de la TPP ( $Do_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ ) dans le toluène, excitée à 414 nm. ....	251
Figure 187 : Spectre d'absorption UV-visible du rose de bengal dans l'EtOH avec une $Do_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ . ....	251

Figure 188 : Spectre de luminescence de $^1\text{O}_2$ après l'excitation à 414 nm du rose de bengal dans l'EtOH ( $\text{Do}_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ ).....	251
Figure 189 : Chromatogramme HPLC, en fluorescence ( $\lambda_{\text{exc.}} = 415\text{ nm}$ et $650\text{ nm}$ ), de purification de la TPC-COOH avec un gradient MeOH/H <sub>2</sub> O/TFA [75/25/0,1] à [100/0/0,1] pendant 15 minutes puis MeOH/TFA [100/0,1] pendant 30 minutes. ....	252
Figure 190 : Spectre RMN $^1\text{H}$ 1D de la P <sub>1</sub> -COOH dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (300 MHz, 300 K).....	252
Figure 191 : Spectre RMN $^1\text{H}$ 1D de la P <sub>1</sub> -NHS dans le CDCl <sub>3</sub> (300 MHz, 300 K).....	253
Figure 192 : Spectre RMN $^1\text{H}$ 1D de la TPC-COOH dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (300 MHz, 300 K).....	253
Figure 193 : Spectre RMN $^1\text{H}$ 1D de la TPC-NHS dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (300 MHz, 300 K).....	254
Figure 194 : Spectre RMN $^1\text{H}$ 1D du peptide ATWLPPR protégé dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (300 MHz, 300 K). ....	254
Figure 195 : Spectre RMN $^1\text{H}$ 1D du peptide ATWLPPR protégé dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (300 MHz, 300 K).....	255



## *Liste des abréviations*



# Abréviations

(+)	dextrogyre
(-)	lévogyre
$\alpha$	proportionnalité
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	hématite
$\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$	une forme allotropique minoritaire de $\text{Fe}_2\text{O}_3$
$\Delta$	chauffage (pour une réaction chimique)
$\epsilon_\lambda$	coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde $\lambda$
$\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$	une forme allotropique minoritaire de $\text{Fe}_2\text{O}_3$
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	maghémite
$\lambda_{\text{emi.}}$	longueur d'onde d'émission
$\lambda_{\text{exc.}}$	longueur d'onde d'excitation
$\pi$	double liaison chimique
$\Phi_\Delta$	rendement quantique d'oxygène singulet
$\Phi_\phi$	rendement quantique de fluorescence
$\nu$	fréquence d'une onde (Hz)
$^\circ\text{C}$	degrés Celsius
$^1\text{O}_2$	oxygène singulet
$A_{o\lambda}$	absorption d'une référence à la longueur d'onde $\lambda$
$A_\lambda$	absorption d'une molécule à la longueur d'onde $\lambda$
A.A	acide aminé
Ac	acétyle
ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
Ahx	acide aminohexanoïque
Ala (A)	alanine
ALA	acide 5-aminolévulinique
AMM	autorisation de mise sur le marché
APTES	(3-aminopropyl)triéthoxysilane
APTMS	(3-aminopropyl)triméthoxysilane
Ar	aryle
ARC	association pour la Recherche sur le Cancer
Arg (R)	arginine
ARN	acide ribonucléique
Asp (D)	acide aspartique
ATG	analyse thermogravimétrique
ATWLPPR	séquence peptidique Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg
AuNps	nanoparticules d'or
$\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$	trifluorure de Bore étherate
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
BRET	<i>bioluminescence resonance energy transfer</i>
BtOH	hydroxybenzotriazole (HOBT)
C	symbole de la fonction acide carboxylique terminale pour un peptide
C	concentration ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

<b>C<sub>α</sub></b>	carbone alpha symétrique
<b>C<sub>1</sub>-COOH</b>	5-4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl-21,23-chlorine (ou TPC-COOH)
<b>CAV</b>	Centre Alexis Vautrin
<b>CCH</b>	fonction alcyne
<b>Ce6</b>	chlorine e6
<b>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub></b>	toluène
<b>CI</b>	conversion interne
<b>CIP</b>	Cahn-Ingold et Prelog
<b>CIRC</b>	Centre Internationale de Recherche sur le Cancer
<b>CIS</b>	conversion inter système
<b>CNRS</b>	Centre National de la Recherche Scientifique
<b>COSY</b>	COrrélation SpectroscopY
<b>cP</b>	centiPoise (unité de viscosité)
<b>CRAN</b>	Centre de Recherche en Automatique de Nancy
<b><sup>64</sup>Cu<sup>2+</sup></b>	ion cuivre (II) isotope 64
<b>Da</b>	Dalton
<b>DCC</b>	dicyclohexylcarbodiimide
<b>DCM</b>	dichlorométhane
<b>DCPR</b>	Département de Chimie Physique des Réactions
<b>DDQ</b>	2,3-dichloro-5,6-dicyanoquinone
<b>DEG</b>	diéthylèneglycol
<b>DH</b>	diamètre hydrodynamique
<b>DL</b>	dose létale
<b>DLS</b>	<i>dynamic light scattering</i>
<b>DMLA</b>	dégénérescence maculaire liée à l'âge
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -diméthylformamide
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>D<sub>o</sub></b>	densité optique
<b>DOTA</b>	1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique acide
<b>DOTAGA</b>	1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique acide -2,2',2''-(10-(2,6-dioxotétrahydro-2H-pyran-3-yl))
<b>DTPA</b>	diéthylène triamine penta acide
<b>DTPABA</b>	diéthylène triamine penta acide dianhydride
<b>DPBF</b>	1,3 diphénylisobenzofurane
<b>EDC</b>	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>ENSIC</b>	Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques
<b>EPR</b>	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
<b>EROS</b>	ROS
<b>eV</b>	électron Volt ( $1,60217657 \times 10^{-19}$ joule)
<b>Fe(III)/Fe(II)</b>	couple Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>
<b>Fe((acac)<sub>3</sub>)</b>	complexe Tris(acétylacétonato) Fe(III)
<b>FENNEC</b>	Formation et Elaboration de Nanomatériaux et Cristaux
<b>Fmoc</b>	9-fluorénylméthoxy-carbonyle
<b>FR</b>	récepteur à l'acide folique ( <i>folic receptor</i> )
<b>FRET</b>	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>

<b><math>^{68}\text{Ga}^{3+}</math></b>	ion gallium (III) isotope 68
<b>GC</b>	gros coeur
<b>Gly (G)</b>	glycine
<b>h</b>	constante de Planck ( $\approx 6,62606957 \times 10^{-34}$ J·s)
<b>H</b>	heure
<b>HBTU</b>	hexafluorophosphate de <i>O</i> -benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium
<b>HpD</b>	<i>hematoporphyrin derivative</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HOBt</b>	BtOH
<b><math>I_{0f}</math></b>	intensité de fluorescence d'une référence
<b><math>I_f</math></b>	intensité de fluorescence d'une molécule
<b><math>I_{0l}</math></b>	intensité de luminescence d'une référence
<b><math>I_l</math></b>	intensité de luminescence
<b>IC</b>	conversion interne
<b>IDL</b>	intervalle drogue-lumière
<b>ILM</b>	Institut Lumière Matière
<b><math>^{111}\text{In}^{3+}</math></b>	ion indium (III) isotope 111
<b>IR</b>	infra rouge
<b>IRM</b>	imagerie par résonance magnétique
<b>ISC</b>	conversion intersystème
<b>i.v.</b>	intraveineux
<b>K</b>	constante de chélation
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>keV</b>	kilo électronvolt
<b>kPa</b>	kilopascal
<b>L</b>	peptide ligand ATWLPPR
<b>LASER</b>	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
<b>LCPM</b>	Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire
<b>Leu (L)</b>	leucine
<b>LPCML</b>	laboratoire de Physico-chimie des Matériaux Luminescents
<b>LRET</b>	<i>luminescence resonance energy transfer</i>
<b>LRGP</b>	Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
<b>LWRPTPA</b>	séquence peptidique Leu-Trp-Arg-Pro-Thr-Pro-Ala
<b>M</b>	$\text{mol.L}^{-1}$
<b><i>m</i>-THPC</b>	<i>m</i> -tétrahydroxyphénylchlorine (Foscan®)
<b>m<math>\Omega</math></b>	milliohm
<b>MB</b>	bleu de méthylène
<b>MEC</b>	matrice extracellulaire
<b>mol%</b>	pourcentage molaire
<b><i>m</i>PEG</b>	poly(éthylène glycol) méthyle éther
<b>MSN</b>	<i>mesoporous silica nanoparticles</i>
<b>MTT</b>	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium



<b>MWCO</b>	molecular weight cut off
<b>n</b>	indice de réfraction
<b><i>n</i></b>	nombre de moles
<b><i>N</i></b>	fonction amine terminale d'un peptide
<b><i>n</i><sub>0</sub></b>	indice de réfraction d'une référence
<b>NIR</b>	proche infra rouge
<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromosuccinimide
<b>NHS</b>	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
<b>nm</b>	nanomètre
<b>nM</b>	nanomoles.litre <sup>-1</sup>
<b>NMM</b>	<i>N</i> -méthylmorpholine
<b>nmol.L<sup>-1</sup></b>	nano-mole par litre
<b>NMP</b>	<i>N</i> -méthylpyrrolidone
<b>NOESY</b>	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
<b>Np</b>	nanoparticule
<b>Np-Ce6</b>	nanoparticule greffée à la chlorine e6
<b>NPs</b>	nanoparticules
<b>NRP</b>	neuropiline
<b>NRP-1</b>	neuropiline-1
<b>NRP-2</b>	neuropiline-2
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b><i>p</i>-TSH</b>	<i>para</i> -toluènesulfonylhydrazine
<b>P<sub>1</sub>-COOH</b>	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine
<b>P<sub>1</sub>-NHS</b>	5-(4-succinimidephényl)-10,15,20-triphénylporphyrine
<b>Pbf</b>	2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofurane-5-sulfonyle
<b>PC</b>	petit cœur
<b>PDT</b>	thérapie photodynamique ( <i>PhotoDynamic Therapy</i> )
<b>PEG</b>	polyéthylène glycol
<b>Ph</b>	phényle
<b>pH</b>	potentiel hydrogène
<b>pm</b>	picomètre
<b>PLGA</b>	poly(D,L-lactide- <i>co</i> -glycolide)
<b>PpIX</b>	protoporphyrine IX
<b>Pro (P)</b>	proline
<b>PS</b>	photosensibilisateur
<b>QD</b>	quantum dots
<b>Q<sub>x</sub></b>	bande du spectre d'absorption d'un photosensibilisateur
<b>R</b>	rectus (D)
<b>r1</b>	relaxation longitudinale des protons en IRM
<b>r2</b>	relaxation transversale des protons en IRM
<b>rayon X</b>	rayonnement électromagnétique produit par une désexcitation électronique de longueur d'ondes comprises entre 10 <sup>-11</sup> m et 10 <sup>-8</sup> m ( <i>X-ray</i> ou <i>RX</i> )

<b>rayon <math>\gamma</math></b>	rayonnement électromagnétique produit par une désexcitation atomique de longueur d'onde inférieure à $10^{-11}$ m ( $\gamma$ -ray)
<b>RGD</b>	séquence peptidique Arg-Gly-Asp
<b>RMN</b>	résonance Magnétique Nucléaire
<b>ROS</b>	<i>reactives oxygen species</i>
<b>rpm</b>	rotations par minute
<b>RV</b>	relaxation vibrationnelle
<b>RX</b>	rayon X
<b>S</b>	peptide scrambled LWRPTPA
<b>S</b>	sinister ( <i>L</i> )
<b>s</b>	constante d'interaction mutuelle
<b>S<sub>0</sub></b>	état fondamental singulet
<b>S<sub>1</sub></b>	premier état excité singulet
<b>S<sub>n</sub></b>	n <sup>ème</sup> état singulet excité
<b>SEMA3A</b>	sémaphorine 3A
<b>SER</b>	système réticulo-endothélial
<b>Si-C<sub>18</sub></b>	silice greffée avec des chaînes carbonée à 18 carbones
<b>Si-R<sub>4</sub></b>	tétraalkyle silicate
<b>SPPS</b>	synthèse peptidique sur phase solide
<b>SPR</b>	résonance de plasmon de surface
<b>SRP</b>	<i>small rigid platform</i>
<b>T1</b>	temps de relaxation longitudinale
<b>T<sub>1</sub></b>	premier état triplet excité
<b>T2</b>	relaxation transversale
<b>T<sub>n</sub></b>	n <sup>ème</sup> état excité triplet
<b>TBO</b>	bleu de toluidine O
<b>tBu</b>	<i>tertio</i> -butyle
<b><sup>99m</sup>Tc<sup>4+</sup></b>	ion technétium (IV) isotope 99m
<b>TEM</b>	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
<b>TEOS</b>	tétraéthoxysilane
<b>TEP</b>	tomographie par émission de positrons ou PET ( <i>positron emission tomography</i> )
<b>TFA</b>	acide trifluoroacétique
<b>TFE</b>	2,2,2-trifluoroéthanol
<b>TGA</b>	ATG
<b>Thr (T)</b>	thréonine
<b>TM</b>	domaine TransMembranaire
<b>TMOS</b>	tétraméthoxysilane
<b>TNBSA</b>	acide trinitrobenzènesulfonique
<b>TOCSY</b>	<i>total Correlation Spectroscopy</i>
<b>TPC</b>	chlorine 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl-21,23
<b>TPC-COOH</b>	TPC
<b>TPP</b>	tétraphénylporphyrine
<b>Trp (W)</b>	tryptophane
<b>u.a</b>	unité arbitraire
<b>UV</b>	ultra-violet
<b>UV-visible</b>	domaine des longueurs d'onde situé entre 200 nm et 800 nm

<b>v/v</b>	composition en volumes d'un mélange
<b>Val (V)</b>	valine
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>VEGFR</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
<b>Vis</b>	domaine du visible situé entre 400 nm et 800 nm
<b>VTP</b>	<i>Vascular Targeted Photodynamic therapy</i>
<b>W</b>	tryptophane
<b>WST-1</b>	4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzène disulfonate
<b><sup>86</sup>Y<sup>3+</sup></b>	ion yttrium (III) isotope 86

# *Introduction générale*



# I. Introduction générale

Le traitement potentiel que constitue la thérapie photodynamique (PDT) peut être envisagé comme une stratégie thérapeutique anticancéreuse locale dans un but palliatif et/ou curatif. Ce traitement est basé sur l'interaction entre trois paramètres essentiels à sa mise en oeuvre : la lumière, un photosensibilisateur (PS) et l'oxygène. Après irradiation du tissu à traiter, à l'aide d'une lumière de longueur d'onde appropriée, le photosensibilisateur présent dans la zone ciblée est excité électroniquement. A partir de cet état, le PS excité va conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*Reactive Oxygen Species*). Parmi toutes les espèces formées, l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) est considéré comme l'espèce principalement responsable des réactions de toxicité cellulaire suite à des réactions de photo-oxydation en présence de dioxygène.

L'intérêt croissant que suscite la PDT réside dans la faible toxicité intrinsèque des photosensibilisateurs employés ainsi que la relative sélectivité de cette technique. Cependant, parmi les photosensibilisateurs existants, un faible nombre est réellement utilisable en PDT, entre autre, du fait des contraintes (hydrosolubilité nécessaire, fenêtre thérapeutique) imposées par les milieux biologiques. Ainsi, la communauté scientifique est toujours à la recherche de PS plus performants. Afin de détruire les tumeurs cancéreuses, deux stratégies sont envisageables : la destruction par effet direct et la destruction par effet indirect. La destruction directe s'applique aux cellules cancéreuses elles-mêmes alors que la destruction indirecte cherche à détruire les néovaisseaux qui alimentent la tumeur en oxygène et en nutriments. La seconde méthode, plus connue sous le nom de *Vascular Targeted PDT* (VTP), est la stratégie retenue par notre équipe.

Lors des thèses antérieures, une première approche a consisté à cibler l'endothélium vasculaire en utilisant une macromolécule formée par le couplage d'un photosensibilisateur (TPC) avec un heptapeptide (ATWLPPR) spécifique de NRP-1 ou Neuropiline-1, co-récepteur du récepteur au VEGF (VEGFR ou *Vascular endothelial growth factor receptor*) qui est un récepteur transmembranaire impliqué dans la vascularisation tumorale. Des travaux antérieurs ont montré que la macromolécule constituée du peptide ATWLPPR lié à la TPC par un bras espaceur Ahx (acide aminohexanoïque) est capable de reconnaître NRP-1. Des tests sur des souris greffées avec des cellules MDA-MB-231 ont montré que le photosensibilisateur couplé au peptide s'accumule principalement au niveau de l'endothélium tumoral et provoque, après son irradiation, un retard de croissance des tumeurs ciblées. Bien que cet assemblage ait montré une affinité au NRP-1 inférieure à celle du peptide seul, il a mis en évidence une amélioration de l'incorporation intracellulaire et une meilleure activité photodynamique du PS adressé pour les cellules surexprimant NRP-1 comparé au PS seul. Cependant, le peptide couplé au PS s'est révélé être dégradé par le système réticuloendothélial. Pour remédier à ce problème, une autre approche a été envisagée afin de limiter la dégradation du peptide, d'augmenter le nombre de peptides et de PS. La solution qui a été retenue consiste à greffer les photosensibilisateurs et les peptides sur des nanoparticules multifonctionnelles de type cœur-coquille (*core-shell*) constituée d'un cœur d'oxyde de gadolinium ( $Gd_2O_3$ ) enrobé d'une couche de polysiloxane biocompatible ( $SiO_x$ ) qui possède des fonctions amines libres ( $NH_2$ ) en surface. Des agents chélatants (nommés également surfactants) sont greffés sur ces fonctions amines libres par la formation d'une liaison amide covalente puis les peptides sont greffés sur les fonctions acide carboxylique des surfactants par la formation d'une liaison amide (Figure 1). Ces nano-objets multifonctionnelles, nommés également SRP (*small rigid platforms*) permettent ainsi d'allier les différentes composantes du traitement en un objet unique pouvant être utilisé en théranostic.

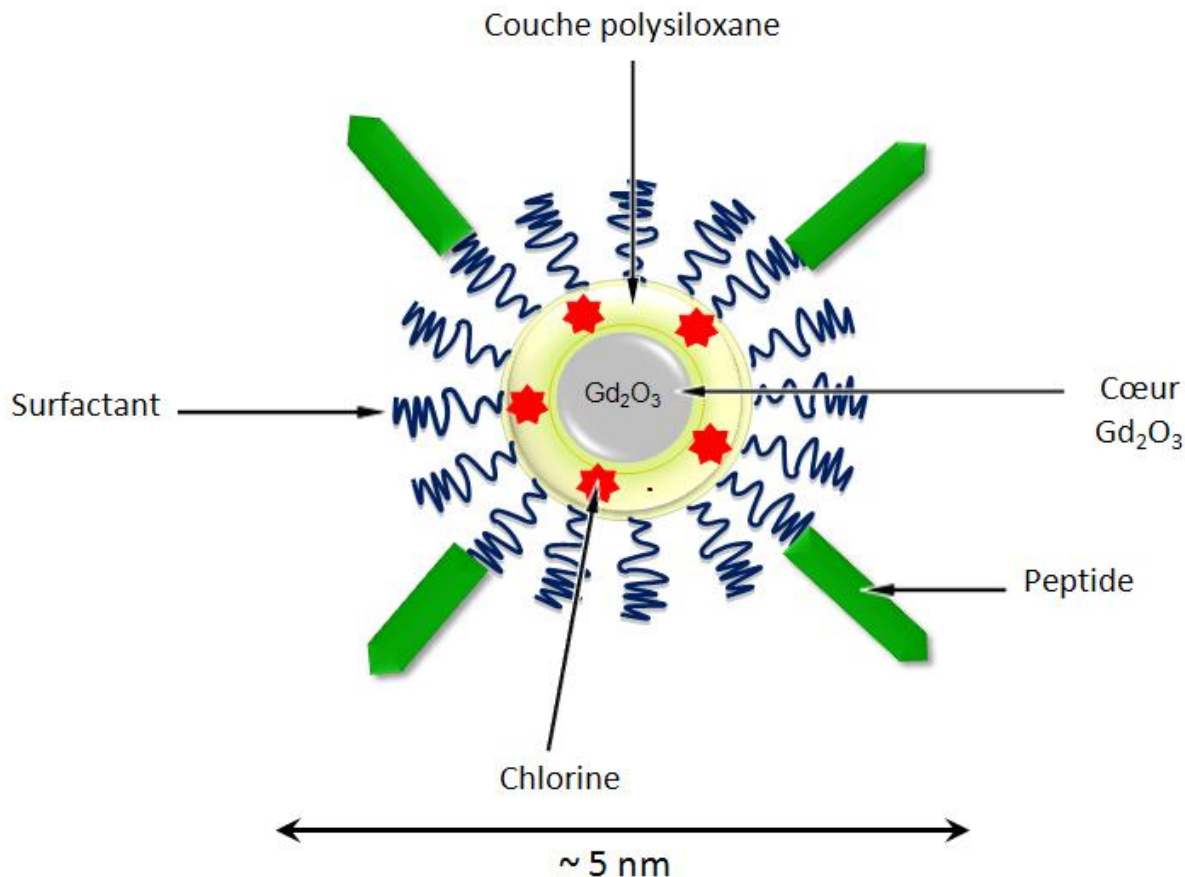


Figure 1 : Schéma d'une nanoparticule.

Le but de ma thèse est de définir et d'optimiser les différents composants chimiques des nanoparticules multifonctionnelles afin d'avoir une efficacité maximale en terme de :

- sélectivité des nano-objets pour NRP-1,
- traitement photodynamique par PDT,
- visualisation tumorale par IRM.

Pour ce faire, un plan d'expérience a été établi permettant de faire varier les différents paramètres que sont le cœur, la couche de silice, le photosensibilisateur et le peptide.

Dans le premier chapitre intitulé « introduction générale » nous aborderons l'histoire du cancer, les premiers cas découverts, ceux dont les symptômes ont été décrits et nous aborderons les premiers traitements utilisés. La deuxième partie de ce chapitre consistera en la description de ce qu'est le cancer et les facteurs influençant son apparition. Il sera également décrit rapidement les différents traitements utilisés à l'heure actuelle.

Le deuxième chapitre traitera de la thérapie photodynamique, les principes généraux, les caractéristiques d'un bon photosensibilisateur ainsi que les quatre générations de photosensibilisateurs élaborés jusqu'à ce jour. Une description des différents nanoparticules à l'étude pour améliorer la vectorisation des photosensibilisateurs conclura ce chapitre.

Le troisième chapitre portera sur mes travaux de thèse. Une brève introduction sera consacrée aux travaux déjà effectués sur les nanoparticules pour le théranostic durant les thèses de Pierre Couleaud et

de Denise Bechet. La théorie des plans d'expérience y sera abordée suivie de la description des nanoparticules, des peptides et des photosensibilisateurs utilisés pour la réalisation de ce plan d'expérience. Ensuite, les manipulations effectuées sur les nanoparticules du plan d'expérience seront décrites et les propriétés photophysiques de chaque lot seront analysées. Les premiers résultats biologiques obtenus avec le lot 5 et le lot 13 seront décrits en se basant sur les deux publications insérées à la suite de ce paragraphe.

Enfin, ce travail sera finalisé par une partie intitulée « conclusion et perspectives » dans laquelle seront exposés les premières conclusions tirées des résultats du plan d'expérience puis plusieurs perspectives y seront avancées.

## **I. 1. Contexte général**

### **I. 1. a. Histoire du cancer et les premiers traitements**

Les premiers cas hypothétiques de tumeurs datent de bien avant l'apparition de l'espèce humaine. Ainsi, une découverte dont le diagnostic est sujet à controverse émet l'hypothèse qu'un fossile de nageoire de *Dinichthys* (un poisson placoderme), datant d'il y a environ 350 millions d'années, présente ce qui pourrait être un vestige de tumeur cancéreuse osseuse. Cependant, cette lésion pourrait être due à une cicatrisation consécutive à une blessure. Il est important de noter que cet animal préhistorique fait partie de l'un des premiers groupes de vertébrés apparus sur Terre ce qui en fait potentiellement le premier vertébré connu atteint par une tumeur. D'autres cas, plus concrets, ont été répertoriés sur des animaux terrestres vivant durant le Jurassique entre -200 et -70 millions d'années, plus particulièrement chez un dinosaure Théropode (*Allosaurus Fragillis*) qui présente des traces incontestables de vestiges de métastases au niveau de l'un de ses humérus <sup>[5-7]</sup>.

Maintenant, intéressons nous de plus près au cas de l'espèce Humaine. En ce qui la concerne, des paléontologues ont retrouvé un fragment de mâchoire d'un *Homo erectus* qu'ils ont nommé « *Kanam mandible* ». Celle-ci présente une grosseur dans la partie symphysienne qui a été attribuée à un possible lymphome de Burkitt's ou à un sarcome osseux. Bien que ce diagnostic soit controversé par des chercheurs qui attribuent cette déformation à une fracture cicatrisée, cela pourrait faire remonter le premier cas de tumeur retrouvée chez les hominidés à 1,5 millions d'années. Cependant, il faudra attendre l'invention de l'écriture pour qu'il reste des traces décrivant plus ou moins précisément les tissus atteints par de possibles tumeurs chez l'être humain. Dans l'ancienne égypte (3000 à 500 avant J.C), les pratiques médicales étaient fortement empreintes de magie et de religion. Les prêtres étaient considérés comme les gardiens ultimes du savoir puisque leur sagesse leur venait directement des dieux. Ainsi, les cancers et les autres maladies étaient majoritairement vus comme des conséquences directes de la « volonté des dieux » et les traitements des maladies étaient donc fortement basés sur la spiritualité et le mysticisme <sup>[5-7]</sup>.

Il est admis que les premières traces écrites datant de cette époque et faisant référence aux cancers se trouvent dans le Papyrus de Edwin Smith (Figure 2). Ce texte égyptien, datant de 1600 avant J.C, concerne la chirurgie des traumatismes généraux et présente les traitements effectués suivant l'aspect des tumeurs. Par exemple, pour une tumeur rouge, chaude et qui suinte de pus, il était recommandé de cautériser au fer rouge ; si la tumeur est froide au touché et non purulente, il était conseillé de la laisser telle quelle <sup>[5-7]</sup>.



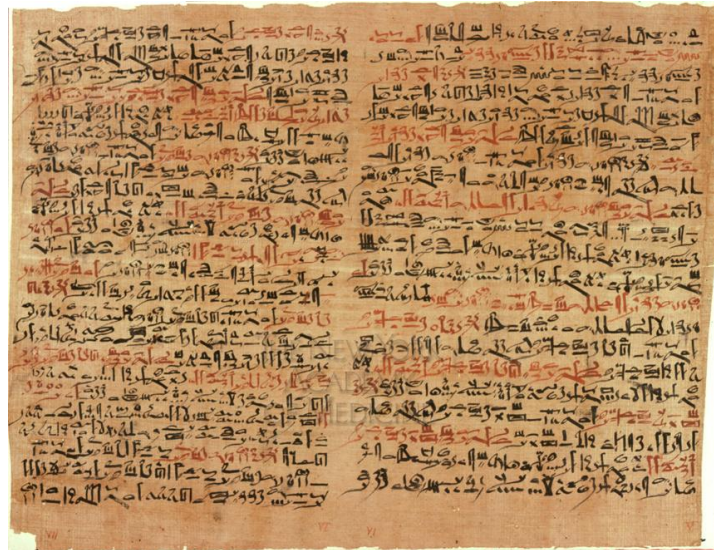


Figure 2 : Photographie du papyrus de Edwin Smith, d'après la référence [8].

A cette époque, une autre façon de traiter les tumeurs consistait en des applications externes dont plusieurs formules sont décrites dans un autre papyrus, celui de Ebers, qui date d'environ 1550 ans avant J.C. Il contient 876 remèdes médicaux et mentionne 500 substances différentes pour traiter les maladies. Celui-ci mentionne notamment un exemple de soins qui consiste en une approche palliative du traitement du cancer utérin par l'insertion d'une purée de dattes fraîches. Un cas d'exostose cartilagineuse, tumeur bénigne caractérisée par une excroissance des tissus, datant de la 12<sup>ème</sup> dynastie d'Egypte a été mis à jour [5-7].

Durant la période gréco-romaine (500 avant J.C à 500 après J.C), l'école d'Hippocrate a été la première à rédiger des documents concernant l'idée que les Grecs se faisaient des cancers. Le Corpus Hippocratique (*Corpus Hippocraticum*) fut le premier texte à avoir utilisé les mots *karkinos* pour décrire des grosseurs inguérissables ou des ulcérations, *karkinoma* pour des tumeurs malignes non-guérisables et le mot *scirrhus* pour décrire des tumeurs dures. Les grecs ont cherché une compréhension « naturelle » de la maladie sans se cantonner à une description mystique de celle-ci, un déséquilibre des « humeurs internes » en devint l'explication. Afin de traiter les maladies et par là même les cancers, il fallait donc rééquilibrer les humeurs. Hippocrate faisait également la différence entre les tumeurs malignes (*karkinoma apertus*) et les tumeurs profondes (*karkinoma occlusus*). Dans le cas de tumeurs superficielles, il conseillait de les enlever par une intervention chirurgicale (excision) mais s'il s'agissait de tumeurs occultes (internes), il conseillait de ne pas intervenir au risque de causer la mort prématurée du patient [5-7].

A l'époque Romaine, le savoir en matière de médecine a, quant à lui, été inscrit dans l'Encyclopédie médicale de Aulus Cornelius Celsus (25 avant J.C à 50 après J.C) dont une partie décrit les cancers et leurs traitements. D'après Celsus, les organes les plus couramment touchés étaient le visage, le nez, les oreilles, les lèvres, les seins, le foie et la rate. Il fut également le premier à classer le cancer du sein suivant quatre degrés : le stade précoce (*cacoethes*), le carcinome sans ulcération de la peau, le carcinome avec ulcération et un stade avancé exophytique (développement vers l'extérieur) avec quelques fois des lésions qui saignent (*thymium*) [5-7].

Plus tard, Claude Galien (*Galen de Pergame*) (129 à 199 après J.C) a cherché à localiser l'origine des maladies, de manière générale, de façon raisonnée avec des concepts rationnels et régionalisés. Il fut le

premier à décrire les tumeurs en utilisant le mot *cancer* qui dérive du mot *cancrium* signifiant crabe en latin parce qu'il pensait que les tumeurs avaient la forme caractéristique d'un crabe. Bien qu'il ait repris la théorie erronée d'Hippocrate concernant les humeurs, Galen a étendu la définition concernant le cancer et il a affiné ce concept en classant les tumeurs en trois types majeurs : les *tumores secundum naturam* (ex : grossissement des seins à la puberté), les *tumores supra naturam* (ex : abcès et inflammations) ainsi que les *tumores praeter naturam* (tumeurs contre nature) comprenant les *onkoi* (grosseurs), les *karkinos* (ulcères malins) et les *karkinomas* (cancers non-ulcérés). La période du Moyen Age, en Europe, (500 à 1450 après J.C) a été caractérisée par un retour en arrière avec la réutilisation des théories humorales d'Hippocrates. De plus, à la fin de cette période, le terme cancer regroupait toutes sortes d'affliction telles que les grosseurs, les gangrènes, les tumeurs, les abcès et l'herpès douloureux. Notons que le squelette d'un jeune Chilien datant de 1100 – 1200 ans après Jésus-Christ, présentant une tumeur géante des cellules osseuses au niveau du fémur, a été retrouvé récemment (Figure 3) <sup>[5-7]</sup>.



Figure 3 : Fémur portant les stigmates d'une tumeur osseuse, d'après la référence [5].



Figure 4 : Crâne montrant des destructions osseuses dues à un glioblastome non traité, d'après la référence [5].

En Europe, il fallut donc attendre la période de la Renaissance pour qu'un chirurgien français, Guy de Chauliac (1300-1370), réintroduise une définition plus concrète du cancer. Cette pathologie fut alors considérée comme correspondante à une tumeur dure, ronde, vascularisée, de couleur foncée, de croissance rapide, chaude et douloureuse <sup>[5-7]</sup>.

Par la suite, le philosophe et physicien français René Descartes proposa la théorie lymphatique des cancers. Suite à cela, Henry Le Dran proposa l'idée que certains cancers ne se propageraient non pas par les humeurs mais par le système lymphatique amenant ainsi l'idée que les tumeurs naissent dans des endroits localisés du corps et qu'il fallait pratiquer des excisions complètes des tumeurs afin d'éviter leur propagation au reste du corps. Ainsi, cette période vit naître de grandes avancées concernant la définition de ce qu'est le cancer, en particulier grâce à la légalisation de l'autopsie humaine qui était, jusque là, interdite et condamnée. Cela permit à John Hill d'observer, en 1761, que les utilisateurs de tabac à priser sont plus susceptibles de développer des cancers nasaux par rapport au reste de la population. De plus, en 1775, Percival Pott décrivit pour la première fois une association entre le cancer du scrotum et le travail de ramoneur, ce qui constitue le premier cas documenté de cancer lié au travail <sup>[9]</sup>. En 1761, s'appuyant sur les observations de 700 autopsies et ses propres observations expérimentales, Giovanni Battista Morgagni fut le premier à désapprouver la théorie cartésienne lymphatique du cancer. A la même époque (1740), il fut construit à Reims le premier hôpital du cancer

nommé : La Lutte Contre Le Cancer. Il fut suivi par l'ouverture, en Angleterre à Middlesex en 1792, du premier Institut pour l'étude de l'histoire naturelle du cancer <sup>[5-7]</sup>.

Le 19<sup>ème</sup> siècle a, quant à lui, marqué un tournant décisif dans la compréhension de ce qu'est le cancer. Ainsi, la théorie des humeurs a été totalement abandonnée au profit d'une théorie cellulaire qui est née grâce à l'invention du microscope optique. Johannes Müller a été le premier à observer les tissus cancéreux ; il put ainsi vérifier, en 1838, que les tumeurs sont faites de cellules et non d'autres « substances » <sup>[5-7]</sup>.

Suite à l'observation d'échantillons tumoraux, Rudolf Virchow utilisa le principe de « pathologie cellulaire » et stipula que les cellules étaient les plus petites unités de corps et que par conséquent les maladies devaient y être localisées, concluant ainsi que le cancer se développe à partir des cellules et non à partir des fluides ou des fibres du corps. Il soutint ainsi un aphorisme révolutionnaire pour l'époque selon lequel chaque cellule vivante provient d'une autre cellule : *omnis cellula a cellula*. En 1858, il publia un texte : *Die Cellula Pathologie* dans lequel il a décrit les détails microscopiques du cancer montrant ainsi le potentiel du microscope pour l'analyse des tissus malades. Il proposa également que les cellules cancéreuses sont engendrées par deux méthodes : l'hérédité (prédisposition constitutionnelle) et l'exposition chronique des cellules à des agents irritants <sup>[5-7]</sup>.

En 1865, Karl Thiersch émit l'hypothèse selon laquelle des cellules malignes provenant de la tumeur principale pouvaient gagner des sites secondaires développant ainsi le concept d'un fluide toxique relargué par les tumeurs malignes (les métastases) <sup>[5-7]</sup>.

### **I. 1. b. Qu'est ce que le cancer ?**

L'organisme est composé de milliards de cellules. Elles naissent, croissent et meurent en permanence pour maintenir l'équilibre des tissus et organes qu'elles constituent <sup>[10]</sup>. L'organisme est programmé pour maintenir un niveau à peu près constant du nombre de cellules à l'âge adulte. On appelle cela l'homéostasie cellulaire et le mécanisme de mort cellulaire naturelle qui lui est associé est l'apoptose. Un cancer correspond à la multiplication anarchique de cellules anormales dans n'importe quel endroit du corps <sup>[10]</sup>. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le terme de cancer est un terme général qui « s'applique à un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme » qui peuvent également être nommées tumeurs malignes ou néoplasmes. « L'un des traits caractéristiques du cancer est la prolifération rapide de cellules anormales qui, au-delà de leur délimitation habituelle, peuvent envahir des parties adjacentes de l'organisme, puis essaimer dans d'autres organes. On parle alors de métastases [...] » qui sont la cause principale de décès par cancer <sup>[11]</sup>. D'après le site internet de cette organisation, il est décrit que le cancer apparaît par un processus de transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale en plusieurs étapes et classiquement par une évolution vers une lésion précancéreuse puis vers une tumeur maligne. Les modifications ainsi observées proviennent d'interactions entre les facteurs génétiques propres à l'individu et les agents extérieurs.

Le cancer est donc une maladie du génome qui a toujours pour origine une mutation génétique de l'ADN contenu dans le noyau de la cellule, héritée ou induite par l'environnement. La nomination du cancer est donc faite en fonction de la cellule initiale dont il provient. La première cellule perd ses caractéristiques initiales et notamment ses capacités d'apoptose. Elle devient donc immortelle et se clone elle-même d'où le terme d'origine monoclonale des cancers <sup>[10]</sup>.

## **I. 1. c. Les facteurs favorisant l'apparition des cancers**

Les facteurs favorisant l'apparition des cancers sont classés suivant deux familles que nous allons brièvement décrire.

### **I. 1. c. i. Les facteurs aggravants ou facteurs subis**

Ces agents dangereux sont classés en trois catégories de facteurs aggravants <sup>[12]</sup> :

- Les cancérogènes physiques : rayonnements ultra-violet et radiations ionisantes,
- Les cancérogènes chimiques : amiante, composants de la fumée du tabac, aflatoxine, arsenic,
- Les cancérogènes biologiques : infections dues à certains virus (*Papillomavirus*), bactéries, parasites.

Le vieillissement est également un facteur fondamental de l'apparition des cancers étant donné que les mécanismes de réparation de l'ADN perdent de leur efficacité avec l'augmentation de la durée de vie <sup>[12]</sup>.

### **I. 1. c. ii. Les facteurs de risques comportementaux**

Ils concernent des substances chimiques qui ont été classées par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) <sup>[10]</sup> : les cancérogènes avérés, les cancérogènes probables et les cancérogènes possibles.

Ces facteurs sont à l'origine de 30% de la mortalité liée aux cancers et ils regroupent <sup>[10]</sup> :

- Le tabagisme,
- La surcharge pondérale et l'obésité dues à la sédentarité,
- La consommation insuffisante de fruits et de légumes,
- Le manque d'exercice physique,
- La consommation d'alcool,
- L'infection par HPV et HBV (hépatites B et C),
- La pollution de l'air des villes,
- Les fumées à l'intérieur des habitations dues aux combustibles solides.

Environ 30% des décès dus aux cancers sont imputables aux cinq principaux facteurs à risque comportementaux et alimentaires qui sont : un indice élevé de masse corporelle, une faible consommation de fruits et de légumes, un manque d'exercice physique, le tabagisme et l'alcool. La consommation de tabac représente ainsi le facteur de risque majeur car elle est responsable de 22% de la mortalité par cancer dans le monde et 71% des décès par cancer du poumon <sup>[10]</sup>. Dans les pays dont la population possède des revenus faibles ou intermédiaires, 20% des décès par cancers sont corrélés avec des infections virales telles que le virus de l'Hépatite B, C et les papillomavirus humains (HPV). Et en 2008, 70% des décès par cancers sont survenus dans ces pays <sup>[10]</sup>. L'estimation mondiale du nombre de cas de cancers en 2030 est de plus de 13,1 millions de cas <sup>[11]</sup> (Figure 5).



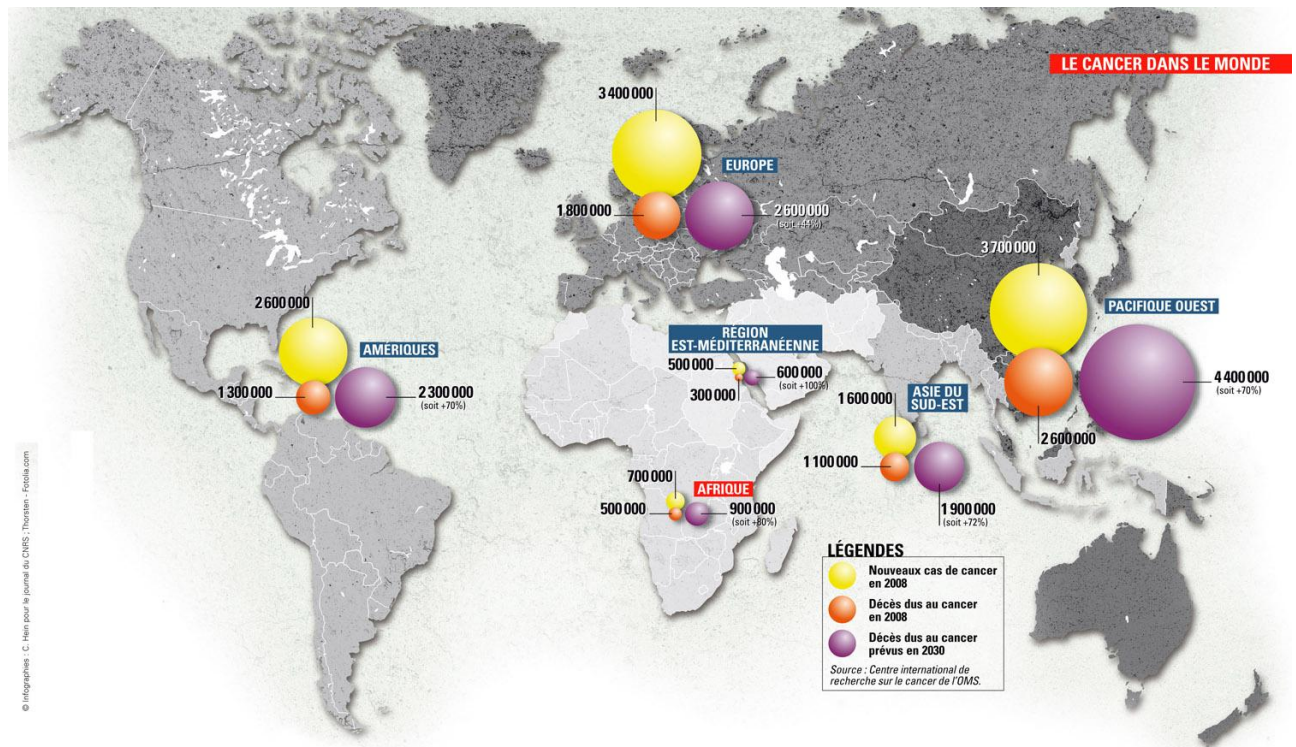


Figure 5 : Planisphère indiquant le nombre de décès dus aux cancers en 2008 et les prévisions pour 2030, d'après la référence [11].

De plus, le taux de déclaration de chaque type de cancer dépend du sexe de l'individu <sup>[2]</sup> (Figure 6).

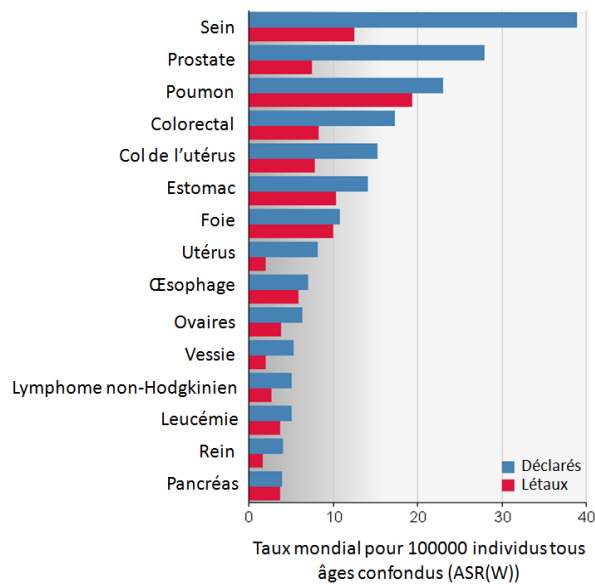


Figure 6 : Répartition mondiale des cancers, sexes et âges confondus en 2008, adapté de la référence [2].

En 2011, en France, le nombre total de cancers déclarés tous sexes confondus a été estimé à environ 365500. Il y a ainsi eu, entre 1995 et 2005, une augmentation de 14% chez l'homme et de 17% chez la femme tous cancers confondus <sup>[11]</sup> (Figure 7).

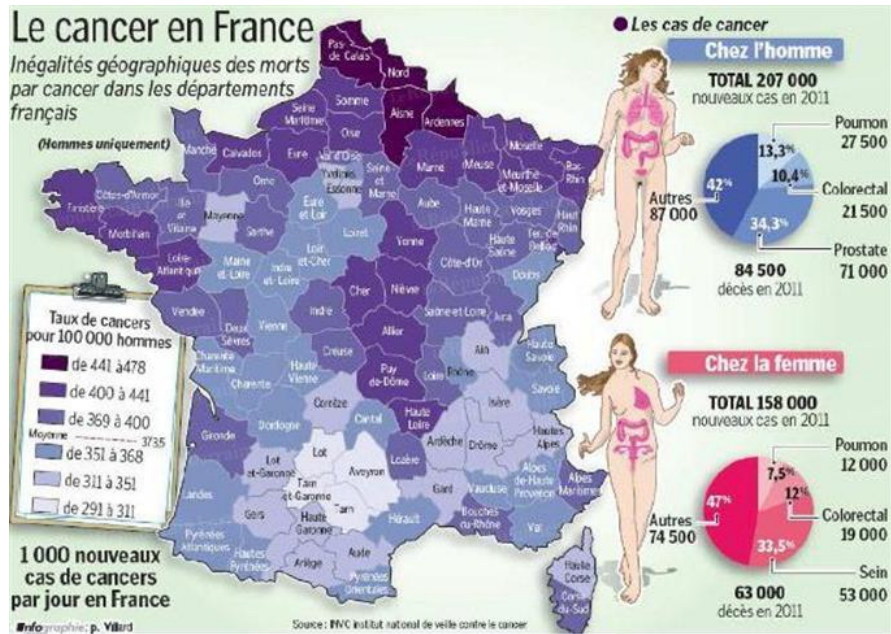


Figure 7 : Carte géographique de la répartition de cancers chez l'homme en France selon les régions en 2011, d'après la référence [13].

## I. 1. d. Classification des cancers

### I. 1. d. i. Les familles de cancers

Les cancers sont classés en quatre groupes (Tableau 1).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des types de cancers recensés et de leurs proportions d'après les références [10, 14].

Nom	Proportion par rapport au total des cancers humains	Forme		Tumeur solide
		Emplacement	Exemples	
Carcinome	90%	se développe sur les couches épithéliales et couvre les surfaces	peau, colon	Oui
Sarcome	2%	cancers des tissus connectifs	muscles, os, cartilages, tissus fibreux	Oui
Leucémie	8%	cellules de formation du sang et moelle osseuse	augmentation du nombre de globules blancs	Non
Lymphome		cellules du système immunitaire	ganglions lymphatiques, amygdales, muqueuse intestinale	Oui

En se basant sur leur potentiel métastatique, il est possible de classer les cancers suivant deux groupes [14] :

- Les tumeurs bénignes ou adénomes lorsque la croissance néoplasique reste localisée en une masse unique,
- Les tumeurs malignes ou adénocarcinomes lorsque les tumeurs envahissent les tissus normaux et se propagent au reste du corps.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement aux tumeurs gliales (ou gliomes) qui font partie de la famille des sarcomes.

### I. 1. d. ii. Les glioblastomes

Avec une incidence de 2400 nouveaux cas par an en France, le glioblastome est la 3<sup>ème</sup> cause de décès par cancer chez l'adulte et le traitement des **tumeurs primaires** malignes du **cerveau** représente un des plus importants défis. La survie médiane sans traitement à partir du diagnostic est de trois mois. Un âge supérieur à 60 ans, une altération de l'état général, une exérèse incomplète sont des facteurs de mauvais pronostic. Le décès est habituellement dû à un œdème cérébral qui entraîne une augmentation de la pression intracrânienne puis une altération de la vigilance. Le traitement de référence s'appuie sur l'exérèse chirurgicale. L'objectif de la chirurgie est d'obtenir une cytoréduction maximale sans altérer le pronostic fonctionnel des patients compte tenu de leur pronostic vital péjoratif. Même en cas d'exérèse satisfaisant, le caractère invasif du glioblastome ne permet pas son contrôle par les approches thérapeutiques conventionnelles. La zone périphérique infiltrante est, quant-à-elle, ciblée par des traitements supplémentaires comme la radiothérapie et/ou la chimiothérapie, avec des dégâts collatéraux importants. Avec le traitement standard, c'est-à-dire la chirurgie puis la radio-chimiothérapie concomitante, la survie médiane est approximativement de 14 mois.

Les recherches se concentrent sur la mise au point de technologies innovantes visant à éviter les dommages observés. Des cas cliniques ont montré que la thérapie photodynamique (PDT) interstitielle se présentait comme une alternative thérapeutique intéressante pour les tumeurs astrocytaires de haut grade après récurrence ou durant la chirurgie ; les îlots tumoraux persistants en berge de la cavité de résection pouvant être détruits grâce à cette technique.

La finalité du projet est donc de proposer une modalité thérapeutique alternative voire complémentaire par thérapie photodynamique interstitielle (fibre optique insérée au sein de la zone tumorale) qui, dans ce contexte, se présente comme une modalité nouvelle de prise en charge des glioblastomes non-opérables. Ainsi, grâce à l'optimisation de nanoparticules multifonctionnelles adaptées à une action combinée en imagerie par résonance magnétique (IRM) et en thérapie photodynamique, nous développons une technologie innovante pour atteindre la vascularisation tumorale, visualiser la tumeur par IRM et la traiter par thérapie photodynamique.

### I. 1. e. Les traitements

De nos jours, pour traiter les cancers, les trois stratégies les plus couramment utilisées sont :

- L'exérèse qui consiste à enlever la masse tumorale par un procédé chirurgical,
- La radiothérapie qui, par des rayons X, permet d'irradier la masse tumorale pour induire une mort cellulaire localisée au niveau de la tumeur,
- Les traitements chimiques ou chimiothérapie pour lesquels on injecte au patient des molécules chimiques par voie intraveineuse afin de détruire préférentiellement les cellules à croissance anarchique par accumulation des molécules à leur niveau.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons uniquement à l'un des traitements chimiques parmi la totalité de ceux-ci, qui sont classés en différentes grandes familles <sup>[15]</sup> :

- Les molécules anti-métaboliques,
- Les molécules qui inhibent l'action hormonale,

- Les molécules qui agissent par l'intermédiaire d'espèces radicalaires, **les photosensibilisateurs et la PDT**,
- Les agents d'alkylation de l'ADN,
- Les agents alkylants et non-alkylants qui interagissent avec la partie « *Minor Groove* » de l'ADN,
- Les molécules d'intercalation dans l'ADN et inhibitrices de la topoisomérase,
- Les molécules de ciblage des tubulines et des microtubules,
- Les molécules qui inhibent les signaux favorisant le développement et la croissance des cellules tumorales.

La famille qui nous importe est celle des molécules agissant par l'intermédiaire d'espèces radicalaires ; cette famille est composée de deux types de molécules : celles générant des espèces radicalaires et/ou des espèces réactives de l'oxygène *in situ* par réaction chimique et celles nécessitant une excitation lumineuse pour agir, les photosensibilisateurs. Les molécules qui agissent chimiquement *in situ* <sup>[15]</sup> sont regroupées dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Molécules utilisées pour la destruction de cellules cancéreuses par production d'espèces réactives de l'oxygène, d'après la référence [15].**

Nomenclature	Structure	Provenance	Exemples	Types de cancers visés
Antracyclines	Chromophore plan contenant un fragment anthraquinone attaché à un sucre aminé	<i>Streptomyces</i>	Doxorubicine (DOX)	Tumeurs solides (cancer du sein, tumeurs solides chez l'enfant ; sarcome des tissus mous ; lymphome agressif)
			Daunorubicine (DNR)	Cancer des lymphocytes aigu ; leucémie myéloïde
			Epirubicine (Pharmorubicin®)	Cancer du sein et des ovaires ; cancer de l'estomac ; cancer du poumon ; lymphome
			Idarubicine (Zavedos®)	Leucémie myéloïde aigue
			Valrubicine (Valstar®)	Traitement <i>in situ</i> du bacille de Calmette-Guérin (BCG) dans le cas du carcinome résistant de la vessie urinaire
Mitoxantrone	Dérivé d'anthraquinone portant une chaîne polyamine latérale. Considéré comme une antracycline portant une fonction hydroxyquinone	Anthracène dione obtenue par synthèse totale	Novantrone®	Cancer du sein ; leucémie promyélocyte accrue (un sous groupe des AML) ; cancer de la prostate androgénodépendant ; sclérose multiple secondaire progressive (MS)
Actinomycine D	Chromophore hétérocyclique et deux pentapeptides cycliques portant des fonctions lactones	Chromopeptide naturel	Dactinomycine®	Maladies trophoblastiques gestationnelles (GTD) ; tumeur de Wilms (néphroblastome) ; rhabdomyosarcome (RMS) ; sarcome de Ewing (cancer des os chez l'enfant)
Chartreusine	Glycoside	<i>Streptomyces Chartreusis</i>	-	Leucémie ; mélanome
Elsamicine A	Glycoside à structure proche	<i>Streptomyces Chartreusis</i>	-	Leucémie ; mélanome



	de celle de la chartreuse			
Bléomycine	Glycopeptide	<i>Streptomyces Verticillus</i>	Bléomycine A Bléomycines B BAPP Liblomycine Tallysomyne S <sub>10b</sub>	Carcinome cellulaire squameux (SCC) ; carcinome testiculaire ; lymphomes malins
Antibiotique de type énédiynes	Macrocyclé avec un système conjugué contenant une double liaison et deux triples liaisons	<i>Micromonospora echinospora</i> <i>Micromonospora calichensis</i> <i>Micromonospora chersina</i>	Néocarzinostatine Espéramicine A <sub>1</sub> Dynémicine A Calichéamicine γ <sub>1</sub>	Carcinome des cellules hépatiques ; leucémie myéloïde accrue
Tirapazamine	3-amino-1,4-dioxo-1,2,4-benzotriazine	Synthèse (herbicide)	SR-4233	Cellules tumorales hypoxiques; cancer du poumon (NSCLC) ; tumeurs solides résistantes
Pencloméline	3,5-dichloro-4,6-diméthoxy-2-(trichlorométhyl)pyridine	Dérivé de la 2-trichlorométhylpyridine	-	Tumeur solide maligne du cerveau chez l'animal (modèle)
Molécule radiosensibilisante	-	Dérivés semi-synthétiques de l'azomycine produite par les <i>Streptomyces</i>	Glutathione Nitroimidazole (étanidazole et pimonidazole, nimorazole, ornidazole) Métronidazole Misonidazole Porfiriomycine RSU-1069	Cancers du col de l'utérus ; cancer de la tête ; cancer du cou ; cancer du poumon
Photosensibilisateur	Cycles porphyrinoïques	Synthèse ou naturels dérivés	PpIX, <i>Hematoporphyrin Derivative</i> , Tétraphénylchlorine, etc	Cancers cutanés superficiels ; cancers de l'œsophage ; cancer de la prostate

Nous nous intéresserons uniquement aux photosensibilisateurs et à leur utilisation en thérapie photodynamique.

## I. 2. La Thérapie Photodynamique ou PDT

### I. 2. a. Historique

#### I. 2. a. i. Les prémices de la PDT : la photochimiothérapie

##### • Les premiers cas d'utilisation de l'interaction molécule-lumière par l'Homme

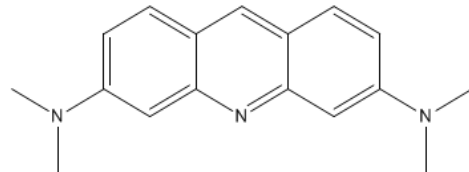
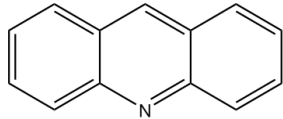
Certaines plantes, comme l'*Ammi Majus Linneaus* sont connues depuis l'Égypte ancienne pour leur capacité, due aux psoralènes qu'elle contient, à faire bruner la peau d'une personne après son ingestion suivie d'une exposition au soleil (héliothérapie) <sup>[16]</sup>. L'homme utilisait cette plante 1600 ans avant J.C pour traiter le vitiligo par un effet de repigmentation artificielle de la peau. Une autre plante, la babchi

(*Psoralea Corylifolia*) dont l'utilisation est mentionnée dans un livre Indien sacré (*Atharava-Veda*) datant de 1400 ans avant J.C.<sup>[17]</sup> contient également des furocoumarines.

## • Les premières molécules pour la PDT

### - L'acridine

Cette molécule, apparentée structurellement à l'anthracène (Figure 8), a été isolée de la fraction à haut point d'ébullition de la houille en 1871 par Gräbe et Caro<sup>[18-20]</sup>.



De nos jours, elle sert de matière première pour la production de pigments et la synthèse de médicaments qui possèdent une activité antiseptique par intercalation dans l'ADN et l'ARN (l'acridine orange ou 3, 6-diméthylaminoacridine)<sup>[21, 22]</sup> (Figure 9). Elle sert aussi de marqueur cellulaire pour connaître leur stade de division<sup>[23]</sup>.

En 1900, Raab, étudiant de Von Tappeiner, fit apparaître le concept d'action photodynamique en décrivant une utilisation de l'acridine dans le *Zeitschrift für Biologie*. Raab montra le caractère phototoxique de cette molécule en plaçant des paramécies (*Paramecium Caudatum*)<sup>[24]</sup> en présence d'acridine orange, qu'il a ensuite laissé à la lumière naturelle. Ce traitement a conduit à la mort des organismes unicellulaires en une heure et demie au lieu de 15 heures lors de la même expérience par temps orageux. Ainsi, il a décrit le rôle clé de la lumière dans le phénomène de phototoxicité<sup>[16, 25]</sup>. En 1904, Raab a démontré le rôle crucial de l'oxygène pour la PDT<sup>[16, 26]</sup>.

C'est en 1905 que Von Tappeiner et Jodblauer rapportent une expérience pour laquelle un processus de consommation de l'oxygène s'opère, dans des protozoaires. Ils émettent l'hypothèse selon laquelle l'oxygène est essentiel dans le processus de traitement<sup>[24, 27, 28]</sup>. Ils introduisent alors le terme d'« effet photodynamique ».

### - L'éosine Y

L'éosine Y ou tétrabromofluorescéine (Figure 10) est un dérivé tétrabromé de la fluorescéine synthétisé par Caro en 1874.

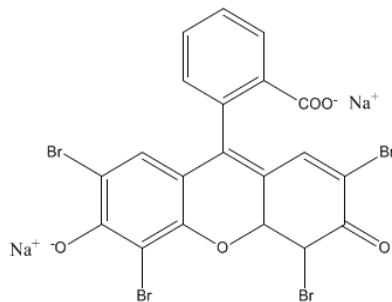


Figure 10 : Structure chimique de l'éosine Y.

Cette molécule a été utilisée en 1903 par Jesionek et Von Tappeiner pour traiter un cancer cutané par application locale d'éosine suivie d'une exposition à la lumière blanche artificielle montrant ainsi l'effet topique de cette molécule. Ils parviennent ainsi à traiter avec succès, chez l'homme des cancers de la peau (*nonmelanoma skin cancers*), la tuberculose cutanée (*lupus vulgaris*), des infections des parties génitales (*condyloma*). Ils deviennent ainsi les premiers à utiliser la PDT comme traitement <sup>[29, 30]</sup>.

### - L'hématoporphyrine

Cette molécule a été produite pour la première fois sous forme impure par Scherer qui, en 1841, a traité du sang séché avec de l'acide sulfurique pour en extraire l'ion fer chélaté obtenant ainsi une substance rouge cristalline qui fut baptisée « hématoporphyrine » (Hp) par Hoppe-Seyler en 1871 <sup>[16]</sup> (Figure 11). Ce ne fut que plus tard, en 1900, que la structure chimique de type tétrapyrrolique de cette porphyrine (transformée) endogène au sang fut élucidée par Nencki et Zaleski <sup>[31]</sup>.

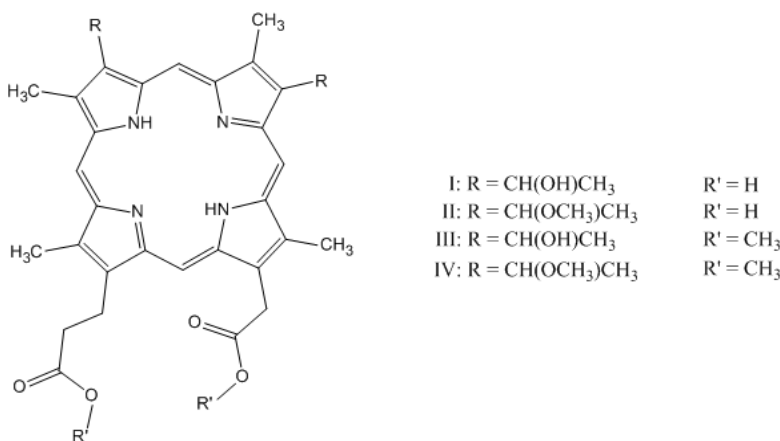


Figure 11 : Structure chimique du mélange d'hématoporphyrines, d'après la référence [5].

En 1908, Hasselbach rédigea le premier rapport sur la phototoxicité potentielle de l'hématoporphyrine chez des souris. Cette hypothèse fut confirmée en 1911 par Hausman qui montra le caractère phototoxique de l'Hp chez le cochon d'Inde (*Guinea Pig*) et la souris, avec une dépendance d'action en fonction de la dose de photosensibilisateur injectée et de la quantité de lumière appliquée. Cette molécule fut utilisée en 1913 par Meyer-Betz afin de prouver que les résultats de phototoxicité mis en évidence chez la souris pouvaient être appliqués à l'homme. Il se servit de son propre corps comme cobaye en s'injectant 200 mg d'hématoporphyrine. Tant qu'il resta à l'abri de la lumière du soleil aucune réaction ne se produisit mais, une fois exposé à son rayonnement, il se produisit une hyperpigmentation de sa peau accompagnée d'un oedème généralisé caractéristique d'une hypersensibilité à la lumière dont il souffrit pendant deux mois après l'injection <sup>[29]</sup> (Figure 12).



Figure 12 : Photographies de Meyer-Betz juste après injection (à gauche) et après que les symptômes d'hypersensibilité aient diminués (à droite), d'après la référence [32].

En 1924, la rétention sélective des porphyrines dans les tissus tumoraux ainsi que la fluorescence spontanée des tumeurs exposées à la lumière ultraviolette fut mise en évidence par Policard, qui interpréta ce phénomène comme provenant de l'accumulation de l'hématoporphyrine biosynthétisée par le corps dans les cellules tumorales <sup>[29]</sup>.

En 1926, Fischer effectua la première synthèse de porphyrine à partir du dipyrrométhane puis il effectua la synthèse de l'hème en 1929 <sup>[33, 34]</sup>. Par la suite, il développa considérablement la chimie des pyrroles, ce qui lui valut l'attribution du prix Nobel de chimie en 1930. Ceci servit de base à Auler et Banzer. En 1942, ils montrèrent que l'Hp est plus concentrée dans certaines tumeurs de la peau que dans les tissus environnants et qu'une fois irradiées, ces zones deviennent nécrotiques. Ces observations ont ainsi servi de tremplin au développement de la PDT <sup>[35, 36]</sup>.

L'affinité de l'hématoporphyrine pour les tissus tumoraux fut confirmée en 1948 par Figge et Weiland qui ont alors suggéré la possibilité de l'utiliser pour la localisation des zones tumorales chez l'homme <sup>[29, 37]</sup>. Ils ont également rapporté que plusieurs types de porphyrines se concentrent plus facilement dans d'autres tissus comme les cellules embryonnaires et les domaines néoplasiques <sup>[16, 38]</sup>. En 1955, Schwartz et al. prouvèrent que l'hématoporphyrine commerciale, obtenue par Nencki et Zaleski (en 1900), issue du traitement de l'hémoglobine par l'acide sulfurique pour éliminer les protéines et l'atome de fer liés au macrocycle <sup>[32]</sup> n'était pas un produit pur <sup>[39]</sup>. Ils la purifièrent en utilisant un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique puis, l'hydrolysèrent avec une base <sup>[39]</sup> et constatèrent que le produit pur était moins sélectif que le produit commercial <sup>[40, 41]</sup>. Cette purification fut reprise par Lipson et al. en 1961 qui proposèrent de traiter l'hématoporphyrine avec un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique puis de la laver avec une base (NaOH). Il en a résulté un nouveau produit dérivé qu'ils nommèrent *Hematoporphyrin Derivative* (HpD) et qui s'est révélé par la suite être un mélange de monomères et de dimères de porphyrines <sup>[32, 38, 42]</sup>. Il purifia ensuite le mélange par HPLC et il isola un mélange de dimères et d'oligomères (Figure 13).

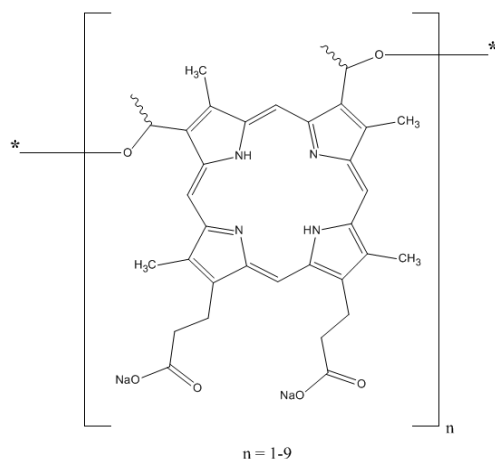


Figure 13 : Structure chimique des oligomères de l'hématoporphyrine.

Cette première génération de photosensibilisateurs porphyriniques développée au début des années 70 a été brevetée et commercialisée sous le nom de Photofrin® est issue du traitement de l'hématoporphyrine monomère est composée uniquement de dérivés de l'hématoporphyrine (HpD) dont la structure porphyrinoïde est substituée en position bêta  $\beta$  sur les cycles pyrroliques. Ce produit est un mélange d'oligomères formés par des ponts éthers et esters entre plusieurs porphyrines <sup>[32]</sup> (Figure 13). En 1972, Diamond et al. ont montré que l'activation de l'hématoporphyrine par la lumière détruit des cellules de gliome de rat *in vivo* et *in vitro* <sup>[43, 44]</sup>.

En 1975, Dougherty et son équipe ont permis le développement sans précédent du traitement anticancéreux émergent que constitue actuellement la thérapie photodynamique <sup>[43, 45, 46]</sup>. En 1976, Dougherty identifie l' $^1O_2$  comme étant l'agent cytotoxique <sup>[47, 48]</sup>. En 1978, L'HpD couplée à une lampe à arc au Xénon fut utilisée avec succès par son équipe pour traiter et soigner des tumeurs mammaires implantées chez la souris <sup>[49]</sup>. Ceci a été suivi en 1978 par les premiers essais réalisés chez l'homme par Dougherty <sup>[30, 49]</sup>. La même année, Bonnett et al. ont purifié l'HpD par HPLC afin d'en extraire les composés majoritairement efficaces (les DHE pour *DiHematoporphyrin Ether and Ester*) <sup>[30, 50]</sup>.

En 1982, Dougherty effectua le premier traitement du cancer du poumon à l'aide d'HpD et d'une source lumineuse <sup>[32, 51, 52]</sup> puis, en 1984, il remplaça la lampe à arc par un laser ( $\lambda_{\text{émi}} \approx 630 \text{ nm}$ ), ce qui a permis d'irradier plus précisément et plus efficacement la zone à traiter <sup>[53, 54]</sup>. Entre 1983 et 1985, il identifie les fractions actives de l'HpD reliant ainsi les propriétés photosensibilisantes du mélange initial avec deux molécules uniquement : l'éther et l'ester de dihématoporphyrine (Figure 14) <sup>[51, 55]</sup>. Il fut ainsi le premier à introduire une version instrumentalisée du traitement PDT pour des applications cliniques.

En 1985, Moan et Sommer ont confirmé la nécessité de la présence d' $O_2$  pour avoir un traitement par PDT <sup>[56]</sup>. Cette même année, une nouvelle version de l'HpD a été enrichie en ses deux composés les plus actifs (DHE) pour être commercialisée en 1985 sous le nom de Photofrin II®. Une autre purification par des méthodes chromatographiques a été tentée afin d'obtenir un DHE sans monomère mais elle n'a pas été concluante <sup>[55]</sup>. Une autre molécule, l'ester de polyhématoporphyrine (PHE), a été développée. C'est un mélange de porphyrines hautement agrégées et stables <sup>[55]</sup> vendue sous le nom de porfimère sodique (*dihaematoporphyrindiether*) et son efficacité est liée aux différentes proportions de dimères et oligomères <sup>[57]</sup> qui le constituent.

Aux USA le Photofrin® a été approuvé par la FDA en 1993 pour le traitement des lésions endobronchiales telles que la maladie de l'œsophage de Barrett et les lésions cancéreuses obstructives de l'œsophage ou encore le traitement des petits cancers du poumon. Ce médicament a, entre autres, été approuvé

mondialement pour le traitement du cancer de la vessie. Ce photosensibilisateur, d'origine naturelle, présente l'avantage d'être facilement obtenu et d'être utilisé depuis longtemps. Cependant, il présente une faible absorption à 630 nm (Figure 15) et un faible rendement de production d'oxygène singulet. De plus, ce photosensibilisateur est peu sélectif et possède une forte photosensibilité rémanente obligeant le patient à rester quelques semaines à l'obscurité.

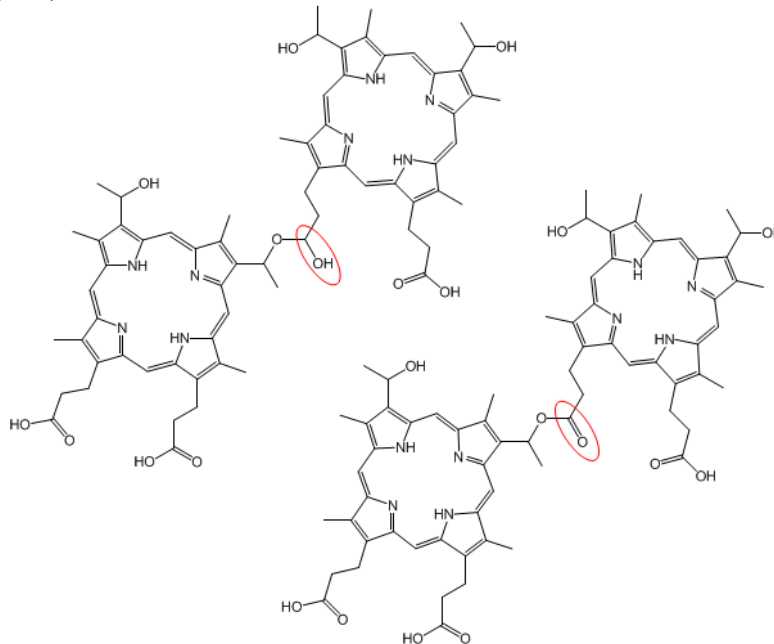


Figure 14 : Structure chimique de l'éther de dihématoporphyrine (en haut à gauche) et de l'ester de dihématoporphyrine (en bas à droite).

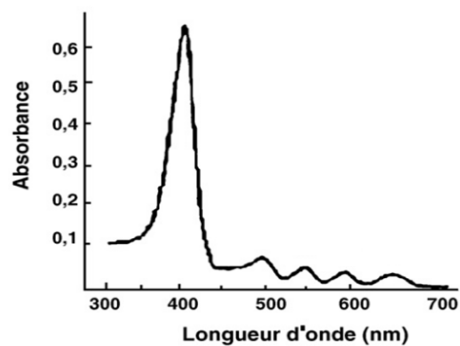


Figure 15 : Spectre d'absorption UV-visible du Photofrin® en solution aqueuse, adapté de la référence [58].

### • Les molécules naturelles et de synthèses ne contenant pas de cycle tétrapyrrolique

Bien que les molécules de type porphyrines soient celles qui nous intéressent pour la suite, il est important de noter que d'autres molécules ont été utilisées tout au long de l'histoire.

#### - Les molécules naturelles

*Les furocoumarines (ou psoralènes) et leurs dérivés*

Les psoralènes sont des molécules chimiques naturelles de la famille des furocoumarines, contenues dans les plantes appartenant à la famille des Umbellifères et des Apiacées (*Umbelliferae*, *Apiaceae*) composées de trois hétérocycles carbonés <sup>[59]</sup>. Ce type de molécules peut agir suivant deux modes d'action distincts. En premier lieu, elles agissent, après photo-activation, en s'intercalant entre les brins d'ADN au niveau des bases pyrimidiques <sup>[60-62]</sup> (Figure 16). Elles sont utilisées par administration orale ou cutanée suivie d'une exposition aux UV-A pour le traitement par photothérapie du vitiligo, et de l'eczéma des mains. De plus, il est intéressant de noter que ces molécules sont également capables de former de l'oxygène singulet lorsqu'elles sont excitées par un rayonnement lumineux <sup>[63]</sup>.

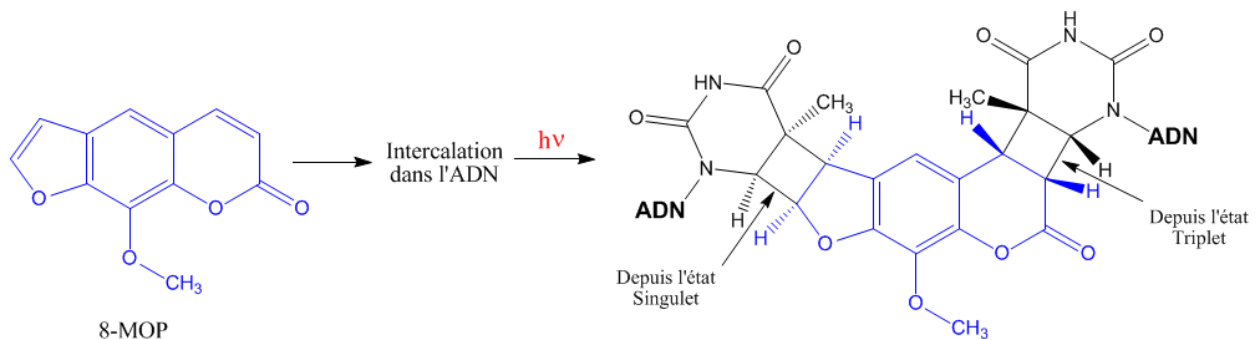


Figure 16 : Schéma d'intercalation des psoralènes entre 2 brins d'ADN, adapté de la référence [15].

Les psoralènes se déclinent en plusieurs isomères dont les cinq principaux sont décrits ci-dessous <sup>[64]</sup> :

### Le psoralène

Le psoralène, a été isolé pour la première fois par Jois et al. en 1933 <sup>[65]</sup>. On le trouve dans les graines de la *Psoralea corylifolia* (babchi), mais aussi dans l'*Ammi Majus Linneaus* (Ammi élevée) ou encore la Berce du Caucase (Figure 17), ainsi que dans d'autres plantes de la famille des *Rutaceae* <sup>[66, 67]</sup>. Cette molécule a été utilisée en PUVA-thérapie (psoralène + UVA) pour le traitement de différentes maladies de peau : le psoriasis, l'eczéma, le vitiligo, certains lymphomes cutanés (lymphomes à lymphocytes T) <sup>[68]</sup> par interaction avec les rayons lumineux (Figure 18).



Figure 17 : La Berce du Caucase ou Berce de Mantegazzi (*Heracleum mantegazzianum*), une plante invasive en Europe de l'ouest, d'après la référence [8].



Figure 18 : Brûlure photochimique suite au contact avec la Berce du Caucase, d'après la référence [8].

### L'hypéricine

Cette molécule fait partie de la famille des quinones dont la forme la plus simple, la benzoquinone ou quinone, a été découverte en 1838 par Woserenski. Cette classe de molécules sert principalement d'agent oxydant dans les réactions organiques et entre dans la constitution de molécules plus complexes telles que l'ubiquinone (coenzyme Q10) ou la phyloquinone (vitamine K1). L'hypéricine (Figure 19), est



un colorant rouge isolé dans le millepertuis commun (*Hypericum perforatum*) (Figure 20) par Brockmann et al. en 1942 et dont l'activité en PDT a été mise en évidence en 1996 par Koren et al. [69, 70]. L'hypéricine possède un spectre d'absorption UV-visible intéressant pour son utilisation en temps que photosensibilisateur, avec une bande d'absorption à 591 nm dont l'épsilon est  $\epsilon = 45000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  dans l'EtOH et une bande d'absorption plus faible à 548 nm [71, 72]. Son activité photodynamique provient de l'action conjuguée d'un radical semi-quinone, de l'oxygène et de l'anion superoxyde [15, 73].

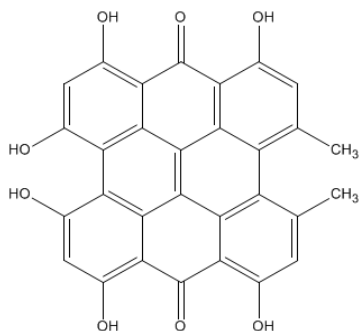


Figure 19 : Structure chimique de l'hypéricine, d'après la référence [71].



Figure 20 : Schéma botanique de l'*Hypericum perforatum* L., d'après la référence [8].

### La curcumine

La curcumine ou diféruoylméthane est un polyphénol présent dans la racine du curcuma (Figure 21) qui est une plante de la famille des gingembres (*Zingiberaceae*). Cette molécule a été extraite en 1904 par Perkin puis sa structure chimique a été identifiée en 1910 par Miłobędzka, Kostanecki et Lampe. La curcumine présente plusieurs formes tautomères dont la forme 1,3-diketo (Figure 22) et deux formes énol équivalentes [74] (Figure 23). Des recherches récentes effectuées avec cette molécule tendent à montrer qu'elle possède un potentiel anticancéreux en PDT [75, 76].



Figure 21 : Schéma botanique du curcuma, d'après la référence [8].

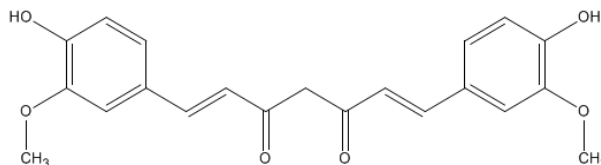


Figure 22 : Structure chimique de la curcumine forme kéto.

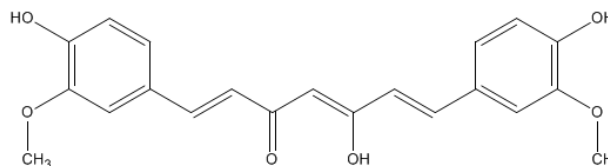


Figure 23 : Structure chimique de la curcumine forme énol.

### • Les molécules de synthèse

#### *Le bleu de méthylène, la première phénothiazine*

Le bleu de méthylène ou chlorure de méthylthioninium [77] (Figure 24) est une molécule cationique qui a été synthétisée pour la première fois en 1876 par Caro [78]. Cette molécule soluble dans l'eau a un



spectre d'absorption UV-visible possédant une forte bande d'absorption à 664 nm dans l'eau ( $\epsilon = 85000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) [79] ainsi qu'une bande plus faible à 609 nm. De plus, son rendement quantique de formation d' $^1\text{O}_2$  est bon ( $\phi_\Delta = 0,51$ ) mais, *in vivo*, la molécule est rapidement dégradée par des réactions enzymatiques, ce qui la rend inutilisable telle quelle pour le traitement tumoral [80]. Il est intéressant de noter que le bleu de méthylène est utilisé pour l'atténuation virale des unités de plasma, comme marqueur de tumeurs (Figure 25) pour aider à la chirurgie et qu'il permet de tester la perméabilité de certaines structures tissulaires [79, 81]. Il est aussi utilisé lors de chimiothérapie anti-cancéreuse comme antidote à l'ifosfamide afin de prévenir les crises de convulsions liées à la neuro-toxicité du produit [82, 83]. Le bleu de méthylène est utilisé pour lutter contre la méthémoglobine ainsi qu'en tant qu'antidote contre les cyanures [77].

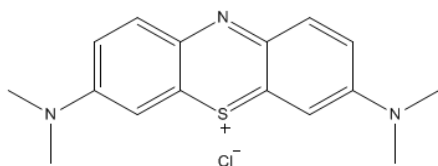


Figure 24 : Structure chimique du bleu de méthylène.

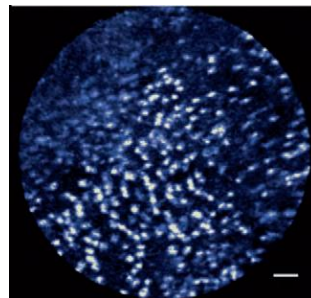


Figure 25 : Couche épithéliale visualisée à 660 nm vue au microscope électronique après application de bleu de méthylène, d'après la référence [6].

### Le rose de bengale

Le rose de bengale (4,5,6,7-tétrachloro-2',4',5',7'-tétraiodofluorescéine) (Figure 26) est un colorant mentionné pour la première fois par Schultz en 1881 [84]. Cette molécule qui était initialement un colorant (Figure 27) pour la laine a été synthétisée par Gnehm en 1882 et possède des propriétés photosensibilisatrices. Elle montre une forte bande d'absorption UV-visible dont le maximum se situe à 549 nm avec un  $\epsilon = 99800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  dans l'eau [85]. Son rendement quantique de formation d' $^1\text{O}_2$  a été déterminé par Gollnick et al. en 1964 ( $\phi_\Delta = 0,86$  dans l'EtOH et de 0,75 dans l'eau) [86, 87]. Le rose de bengale a également été utilisé sous forme d'un médicament appelé PV-10 pour le traitement de mélanome métastatique [88].

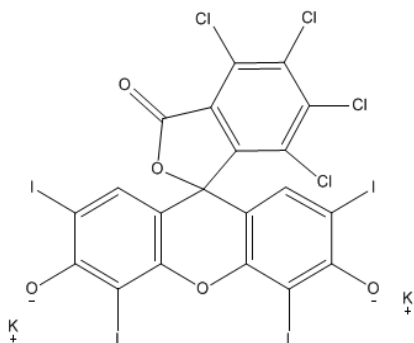


Figure 26 : Structure chimique du rose de bengale.



Figure 27 : Photographie d'une image au microscope électronique d'une *Loricifera Spinoloricus* marquée au rose de bengale, d'après la référence [89].

## • Les complexes métalliques

### - Les complexes de ruthénium

Les complexes de ruthénium se sont révélés être des producteurs efficaces d' $^1\text{O}_2$  et même plus efficaces que d'autres molécules comme le bleu de méthylène et le rose de bengale. En particulier, le complexe de Ru(II) tris-bipyridine ( $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ) (Figure 28) s'est révélé être un photosensibilisateur efficace. Il possède un maximum d'absorption à 452 nm ( $\epsilon_{452} = 14600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) dans l'eau <sup>[90]</sup> et un rendement quantique de production d' $^1\text{O}_2$   $\phi_{\Delta} = 0,86$  dans le méthanol saturé en oxygène à une pression de 1 atm [ $\phi_{\Delta}(\text{CD}_3\text{OD}) = 0,73$  ;  $\phi_{\Delta}(\text{D}_2\text{O}) = 0,22$ ] <sup>[86, 91]</sup>.

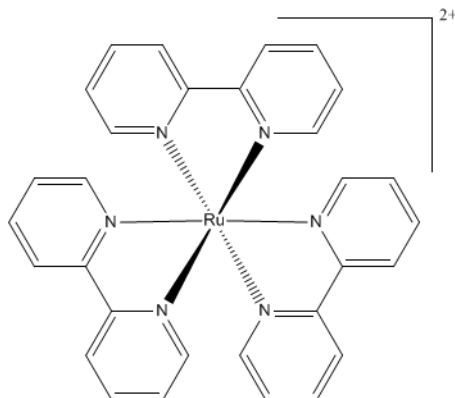


Figure 28 : Complexe de chlorure de tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium(II), d'après la référence [91].

## I. 2. a. ii. Les molécules naturelles tétrapyrroliques (la chlorophylle et ses dérivés)

### • La chlorophylle

La chlorophylle est la molécule de la respiration des végétaux chlorophylliens. Cette molécule naturelle (Figure 29) représente en moyenne entre 0,1 et 1% en masse d'une feuille (jusqu'à 1% pour l'épinard) <sup>[92]</sup> et elle peut être facilement extraite des algues bleues de type *Spirula*. Son spectre d'absorption UV-visible possède un maximum à 660 nm pour un  $\epsilon$  d'environ  $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  et un rendement d' $^1\text{O}_2$   $\phi_{\Delta} = 0,57$  dans le  $\text{CCl}_4$  <sup>[93, 94]</sup>. La production d' $^1\text{O}_2$  se fait par l'intermédiaire de la chaîne carbonée qui sert d'antenne en captant le surplus d'énergie qui n'a pas été utilisé pendant le processus de photosynthèse <sup>[95, 96]</sup>. Malheureusement, elle est insoluble dans l'eau et instable en présence de lumière, d'un acide, d'une base ou d'un alcool <sup>[93, 97]</sup>.

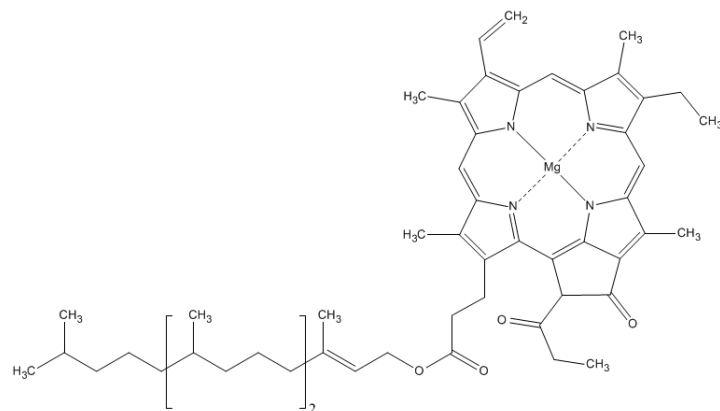


Figure 29 : Structure chimique de la chlorophylle a.

### • La chlorophyllide a

La chlorophyllide a (Figure 30) est obtenue par hydrolyse enzymatique <sup>[98]</sup> de la chaîne ester phytol fixée sur le carbone numéro 17 de la chlorophylle mais, elle entre également dans la réaction de production de la chlorophylle <sup>[99]</sup>. Son rendement d' $^1O_2$ , assez faible, de 0,3 à 0,4 dans le  $CCl_4$  fait que cette molécule n'est pas très utilisée <sup>[93, 97]</sup>. La protochlorophyllide a déjà été testée en PDT pour la destruction de bactéries et semble être phototoxique par un mécanisme de type I <sup>[100]</sup>.

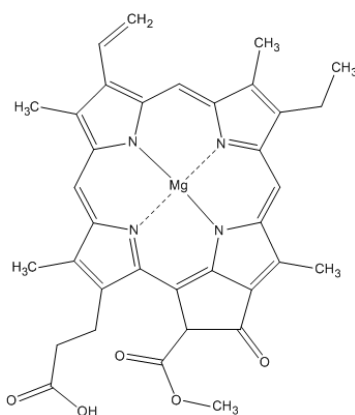


Figure 30 : Structure chimique de la chlorophyllide a.

### • La phéophytine

Cette molécule (Figure 31) fait partie du cycle de photosynthèse de la chlorophylle a. Elle ne possède pas d'ion métallique chélaté contrairement à la chlorophylle <sup>[101]</sup>. Les phéophytines a et b se sont révélées photocytotoxiques vis-à-vis de cellules du cancer du sein sensibles (MCF-7) et multirésistantes à la chimiothérapie (MCF-7/ADR) <sup>[93, 102, 103]</sup>.

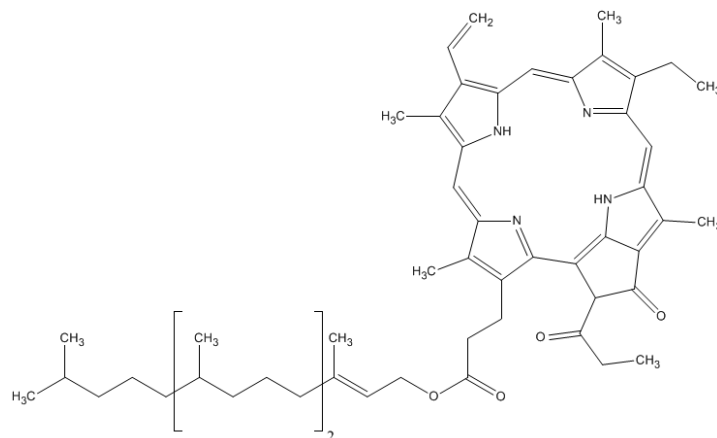


Figure 31 : Structure chimique de la phéophytine a.

### • La purpurine-18

Les purpurines ont été identifiées au début des années 1940 en tant que produit de dégradation de la chlorophylle puis elles ont été synthétisées en 1960. En 1986, Morgan et Tertel ont rapporté la synthèse de la octaéthyl-purpurine et de l'étiopurpurine <sup>[104]</sup>. La purpurine-18 (Figure 32) possède un cycle anhydride qui est le résultat du clivage, par oxydation, du cycle isopentanone E du phéophorbide a et de ses esters ou qui est obtenu directement à partir d'un extrait brut de chlorophylle a <sup>[105]</sup>. Elle est lipophile et possède un pic de forte absorption UV-visible à 700 nm avec un  $\phi_{\Delta} = 0,7$  dans le  $\text{CCl}_4$  <sup>[106, 107]</sup>.

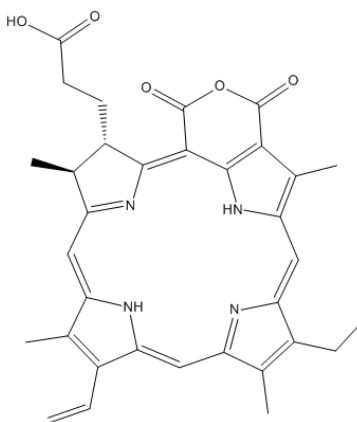


Figure 32 : Structure chimique de la purpurine-18.

### • Le phéophorbide a

Cette molécule est obtenue par élimination acide de la chaîne latérale phytol et du Mg central de la chlorophylle a <sup>[108, 109]</sup> (Figure 33). Elle possède un coefficient d'extinction molaire à 660 nm qui est d'environ les 2/3 de celui de la chlorophylle a. Elle est stable aussi bien à la lumière que dans le noir avec un rendement  $\phi_{\Delta}$  d' $^1\text{O}_2$  d'environ 0,6 dans le  $\text{CCl}_4$  <sup>[97]</sup>. Des études réalisées sur cette molécule ont montré que son efficacité de phototoxicité est supérieure à celle du Photofrin® sur les cellules du carcinome du colon et du pancréas <sup>[97, 110, 111]</sup>.

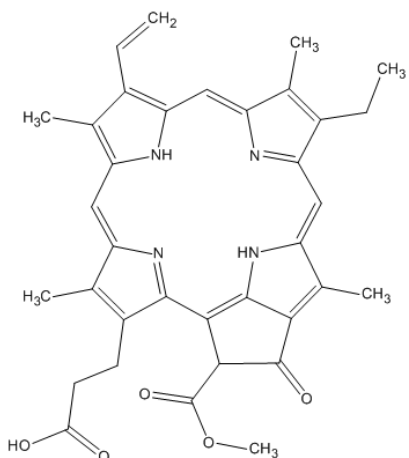


Figure 33 : Structure chimique du phéophorbide a.

### • La chlorine e6

La chlorine e6 (Figure 34) est formée à partir d'une hydrolyse anaérobie en milieu alcalin du phéophorbide a pour donner un dérivé tricarboxylique soluble dans l'eau. Elle absorbe à 654 nm et possède un rendement  $\phi_{\Delta}$  d' $^1\text{O}_2$  de 0,7 dans le  $\text{CCl}_4$ . Lorsqu'elle est métallée avec des ions  $\text{Sn}^{\text{IV}}$ , son pic d'absorption maximum UV-visible se décale à 632 nm et elle génère de l' $^1\text{O}_2$  avec un rendement  $\phi_{\Delta} = 0,83$  dans le  $\text{CCl}_4$  [97]. Cette molécule a montré des propriétés antibactériennes [112] et cytotoxiques en PDT [113].

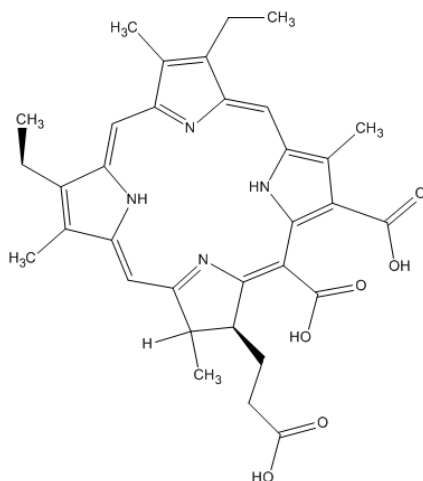


Figure 34 : Structure chimique de la chlorine e6, d'après la référence [113].

### • Les bactériochlorophylles

Ces molécules (Figure 35) possèdent un coefficient d'extinction molaire élevé aux grandes longueurs d'onde ( $\lambda_{\text{max}} = 760\text{-}780$  nm,  $\epsilon = (4 \text{ à } 10) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). De plus, elles sont capables de générer des ROS avec un fort rendement quantique ; ce rendement variant suivant le métal complexé au centre ainsi que les substituants périphériques. Malheureusement, les bactériochlorophylles sont beaucoup moins stables que les chlorophylles analogues du fait de leur dégradation par oxydation chimique ou photochimique conduisant à la formation de leur chlorophylle correspondante [114, 115].

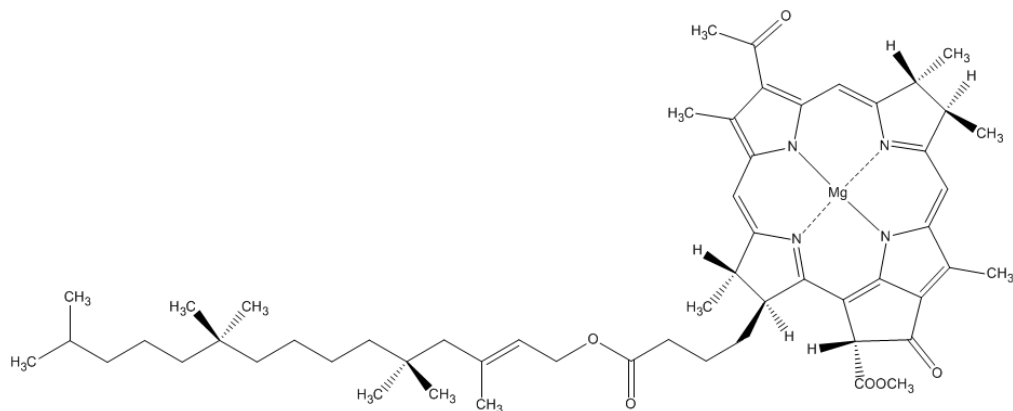


Figure 35 : Structure chimique de la bactériochlorophylle a, d'après la référence [116].

## I. 3. Etat de l'art de la PDT

### I. 3. a. Principes généraux

La PDT est une thérapie anticancéreuse basée sur l'association de trois composants :

- Une molécule photosensibilisatrice (PS),
- Une source lumineuse,
- De l'oxygène.

Après une administration locale ou générale du photosensibilisateur suivie d'un intervalle drogue-lumière variable (quelques minutes à deux jours), une irradiation sélective est appliquée sur la région à traiter avec une lumière de longueur d'onde et une puissance appropriées. Ceci a pour conséquence, en présence d'oxygène, de générer des entités réactives de l'oxygène ( $^1O_2$  et radicaux libres) appelés également ROS qui sont capables de détruire le tissu tumoral ciblé [86, 95, 117-121].

#### I. 3. a. i. Les principes photophysiques de la PDT

##### • Mécanisme général

Les molécules photosensibles ont la capacité de passer de leur état fondamental à un état excité par absorption d'un photon dont la longueur d'onde se situe dans le domaine du visible (Figure 36). Suite à son excitation par un rayon lumineux incident de longueur d'onde définie, le photosensibilisateur passe de son état fondamental singulet  $S_0$  à un état singulet excité de courte durée de vie ( $S_n$ ) [32, 86, 122] (Figure 36.1). Après désexcitation non-radiative, le photosensibilisateur passe à un état excité  $S_1$ . Depuis cet état excité  $S_1$  ( $\approx 200 \text{ kJ.mol}^{-1}$  [32]), le photosensibilisateur va pouvoir retourner à son état fondamental  $S_0$  par émission de fluorescence (Figure 36.2), un processus non radiatif (Figure 36.3) ou par conversion interne (CI). Dans le cas de photosensibilisateurs agrégés, un quenching de fluorescence va également intervenir comme mode de désexcitation non radiatif. De cet état  $S_1$ , le photosensibilisateur peut aussi passer à son premier état excité triplet  $T_1$  ( $\approx 150 \text{ kJ.mol}^{-1}$  [32]) par conversion intersystème (CIS) (Figure 36.4). A partir de l'état  $T_1$ , le PS peut, soit se désexciter par émission de phosphorescence (Figure 36.5), soit revenir à son état fondamental  $S_0$  par désexcitation non radiative (Figure 36.6). L'état  $T_1$  possède un temps de vie suffisamment long pour lui permettre d'intervenir dans une réaction chimique de type I (Figure 36.7) qui correspond à des transferts d'électrons et/ou des transferts d'atomes hydrogène

conduisant à la formation d'espèces hautement réactives de l'oxygène (radicaux libres, oxyanions, ...) (Figure 36.8). Depuis l'état  $T_1$ , il peut également se produire une réaction de type II (majoritaire <sup>[123]</sup>) qui correspond à un transfert d'énergie du photosensibilisateur (donneur) vers un accepteur qui est le plus fréquemment l'oxygène (Figure 36.9). Ce transfert d'énergie à une molécule d'oxygène se trouvant à l'état fondamental triplet ( $^3O_2$ ) va conduire à la formation d'une molécule d'oxygène à l'état singulet excité ( $^1O_2$ ) qui est une espèce hautement réactive (Figure 36.10). Les radicaux libres et l'oxygène singulet générés lors de ce processus sont également appelés ROS <sup>[95, 117, 118, 124]</sup>. Bien que l'oxygène singulet soit l'espèce majoritairement formée lors de la PDT, les radicaux libres sont plus facilement formés que cette dernière lorsque le milieu est pauvre en oxygène et riche en substrat <sup>[125]</sup>.

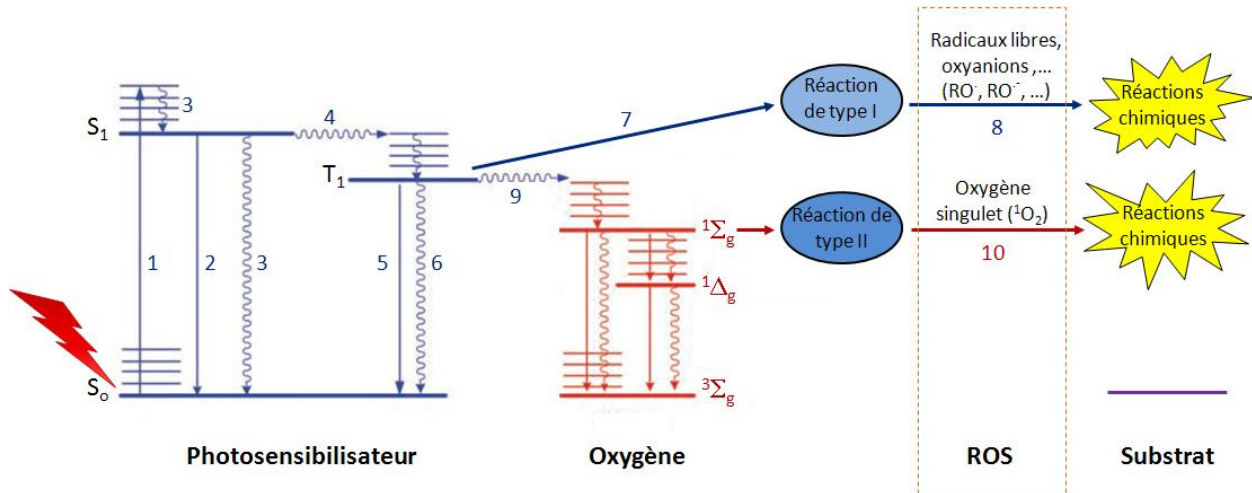
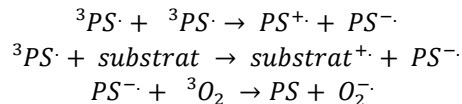


Figure 36 : Diagramme de Jablonski des transferts énergétiques conduisant à la formation de ROS à partir d'un photosensibilisateur, adapté de la référence [125].

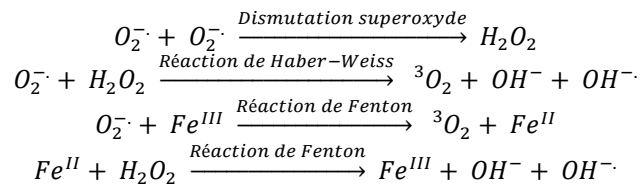
Le ratio entre la production de radicaux libres et d' $^1O_2$  dépend de plusieurs facteurs dont font partie le type de photosensibilisateur, l'oxygénation du milieu et l'environnement moléculaire dans lequel il se trouve. Une forte concentration en  $O_2$  favorisera la formation d' $^1O_2$  alors qu'une condition hypoxique et riche en matière organique favorisera la formation de radicaux libres <sup>[125]</sup>.

## • Equations de formation des ROS

### - Mécanisme de type I

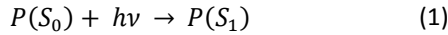


Equation 1 : Equations des réactions photochimiques primaires, d'après les références [86, 122, 126-128].

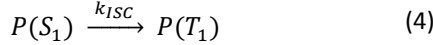
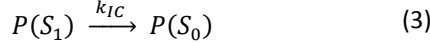
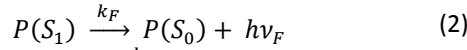


Equation 2 : Equations des réactions photochimiques primaires, d'après les références [126].

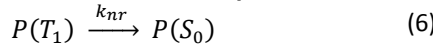
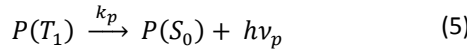
- **Mécanisme de type II**



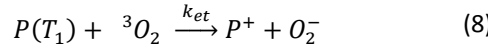
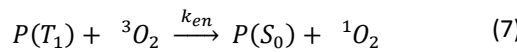
Equation 3 : Réaction d'excitation d'un photosensibilisateur, d'après les références [86, 122, 129, 130].



Equation 4 : Réactions de désexcitation d'un photosensibilisateur depuis son état excité  $S_1$ , d'après les références [130].



Equation 5 : Réactions de désexcitation d'un photosensibilisateur depuis son état excité  $T_1$ , d'après les références [130].



Equation 6 : Réactions de transfert d'énergie du photosensibilisateur au dioxygène, d'après les références [130].

**I. 3. a. ii. L'oxygène singulet**

Dans la nature, la formation naturelle de l' ${}^1O_2$  est responsable de la coloration rouge des aurores boréales (Figure 37). Cette espèce chimique se forme naturellement dans la haute atmosphère lors de la photodissociation de l'ozone présent à cette altitude par les électrons provenant des vents solaires [131] (Figure 38).



Figure 37 : Aurore boréale montrant la fluorescence de l' ${}^1O_2$  formé dans la haute atmosphère lors de son interaction avec les vents solaires, d'après la référence [8].

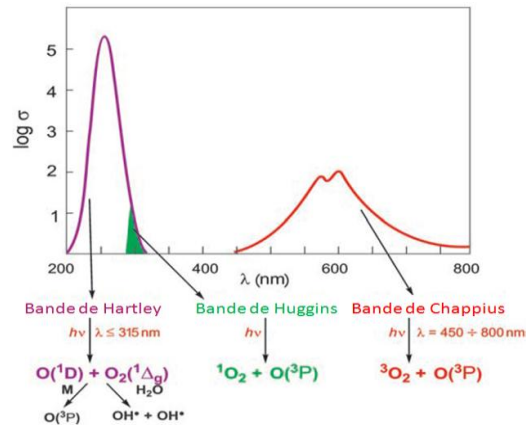


Figure 38 : Spectre électronique de l'ozone et de ses produits de photodissociation générés suivant différentes bandes d'excitation, adapté des références [125, 131].

L'idée selon laquelle l'oxygène est une espèce chimique stable qui nécessite des mécanismes d'activation spécifiques pour prendre part aux processus biologiques et chimiques est apparue dans la littérature du milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle. Il semblerait que Schönbein, le découvreur de l'ozone, soit l'auteur de cette conception. Ainsi, le terme de « oxygène actif (excité) » a été couramment utilisé dans les travaux de ses successeurs [132]. La théorie de la peroxydation formulée à la fois par Bach et Engler en 1897 a constitué une étape importante dans la compréhension des mécanismes d'activation de l'oxygène. Bach a défini cette théorie à partir de ses travaux sur la photosynthèse alors que, pour sa part, Engler étudia le pétrole et sa production [27, 132].



Les orbitales moléculaires de l'oxygène dans son état triplet et ses deux états singulets ont ensuite été décrit par Mulliken dans les années 1920 [133]. L'oxygène singulet est un état particulier du dioxygène dont la théorie a été proposée en 1924 par Lewis [86, 133]. Dans les années 1960, Foote et Wexler ont conduit des expériences grâce auxquelles ils ont mis en évidence qu'il est possible d'obtenir de l' $^1\text{O}_2$  suivant deux voies différentes [133] :

- Une réaction photochimique par photo-oxydation d'un photosensibilisateur,
- Une réaction chimique entre NaOCl et  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En 1931, Kautsky et de Bruijn ont conduit une série d'expériences, à l'aide de la tryptaflavine et de la *leucomalachite green*, qui leur ont permis de montrer que les molécules de  $\text{H}_2\text{O}$  ne sont pas la source de l' $\text{O}_2$  intervenant dans la réaction [133]. Sa première synthèse a été effectuée en 1963 par Khan et Kasha qui ont mélangé de l'hypochlorite de sodium (Eau de Javel®) avec du peroxyde d'hydrogène, ce qui leur a permis d'observer une chimioluminescence rouge. Ils ont alors attribué cette luminescence à la libération de molécules d' $^1\text{O}_2$  [133]. En 1976, Weishaupt et al. ont proposé l'idée que l'agent cytotoxique responsable de la photoinactivation des cellules mises en contact d'un photosensibilisateur irradié est l'oxygène singulet [133]. Lors de sa formation, l'oxygène singulet peut atteindre deux états distincts suivant la configuration de spin de ses électrons. On trouve donc, pour cette molécule, un premier état excité nommé  $^1\Delta_g$  possédant une énergie de  $95 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  et un second état excité  $^1\Sigma_g^+$  de  $158 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Les molécules de dioxygène à ces deux états d'excitation ne diffèrent que par la structure de leurs orbitales  $\pi$  antiliantes ( $\pi^*$ ). A l'état excité  $^1\Delta_g$  (*Zwitterion*), les deux électrons se trouvent sur la même orbitale  $\pi$ , alors que les électrons de l'état excité  $^1\Sigma_g^+$  sont répartis sur les deux orbitales  $\pi$  mais avec des spins inversés. Les spins inversés des électrons de l'état excité  $^1\Sigma_g^+$  sont ce qui différencie cet état de l'état fondamental  $^3\Sigma_g^-$  [86, 122, 128] (Figure 39).

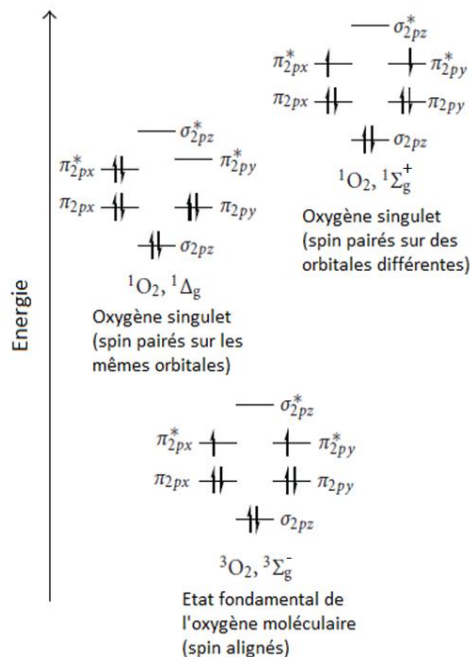


Figure 39 : Diagramme des orbitales moléculaires du dioxygène, adapté de la référence [127].

La transition de l'état  $^1\Delta_g$  à l'état  $^3\Sigma_g^-$  étant interdite, cette propriété confère un temps de vie relativement long aux espèces de l'oxygène singulet formées à l'état d'énergie  $^1\Delta_g$ . Le second état excité

de l'oxygène ( $^1\Sigma_g^+$ ) possède, quant à lui, un temps de vie très court du fait de la transition de spin permise entre l'état  $^1\Sigma_g^+$  et l'état  $^1\Delta_g$ . Il y a donc, en solution, des temps de vie radiative très différents entre l'oxygène  $^1O_2$  à l'état  $^1\Sigma_g^+$  ( $10^{-11}$  à  $10^{-9}$  seconde) et celui à l'état  $^1\Delta_g$  ( $10^{-6}$  à  $10^{-3}$  seconde). L'état  $^1\Delta_g$  possède un temps de demi-vie suffisamment long (de l'ordre de 1  $\mu$ s dans l'eau) pour lui permettre de réagir chimiquement avec son environnement contrairement à l'oxygène singulet  $^1\Sigma_g^+$  [86, 122]. La luminescence observée dans le cas de  $^1O_2$  correspond donc à la transition  $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$  dont la longueur d'onde maximale d'émission se situe à 1268 nm dans l'hypochlorite de sodium acidifié avec de l'HCl [134] et dans le  $CCl_4$  [86, 122, 135] (Figure 40).

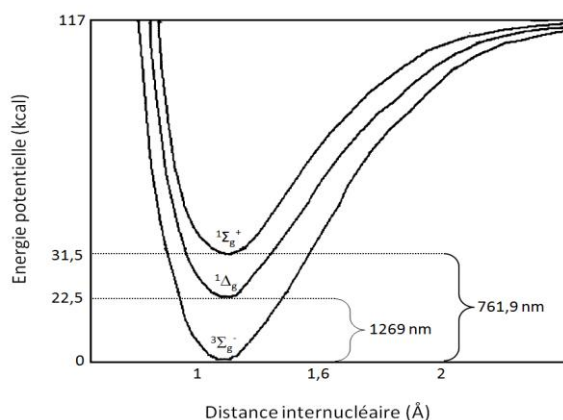
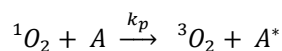


Figure 40 : Courbes des énergies potentielles des électrons de l'oxygène en fonction de l'état énergétique de la molécule, adapté de la référence [86].

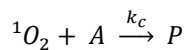
Une fois formé,  $^1O_2$  peut être inhibé selon deux mécanismes :

- Par quenching physique dans lequel les interactions mènent uniquement à la désactivation de l'oxygène singulet en oxygène à l'état triplet sans consommation de  $O_2$  ou formation de produit de réaction [122] (Equation 7).



Equation 7 : Réaction de quenching physique de l'oxygène singulet, d'après la référence [122].

- Par quenching chimique dans lequel le quencher réagit avec  $^1O_2$  pour donner un nouveau produit [86, 122] (Equation 8).



Equation 8 : Réaction de quenching chimique de l'oxygène singulet, d'après la référence [122].

Cette réaction d'oxydation ou d'oxygénation se retrouve pour tous les photosensibilisateurs. L'attaque de ces entités hautement réactives se produit sur les doubles liaisons C=C d'alcènes riches en électrons (réaction de Diels-Alder, réactions sur les alcènes, 2+2 cyclo-additions) des PS [101, 136]. Ce phénomène est la conséquence de la destruction des molécules de photosensibilisateurs (Figure 41). Ce phénomène appelé *photobleaching* (ou photoblanchiment) est caractérisé par une perte du pouvoir sensibilisant des photosensibilisateurs après leur exposition prolongée à la lumière. Chaque molécule de photosensibilisateur peut produire de  $10^3$  à  $10^5$  molécules d'oxygène singulet avant d'être dégradée [130] par ce même  $^1O_2$ .

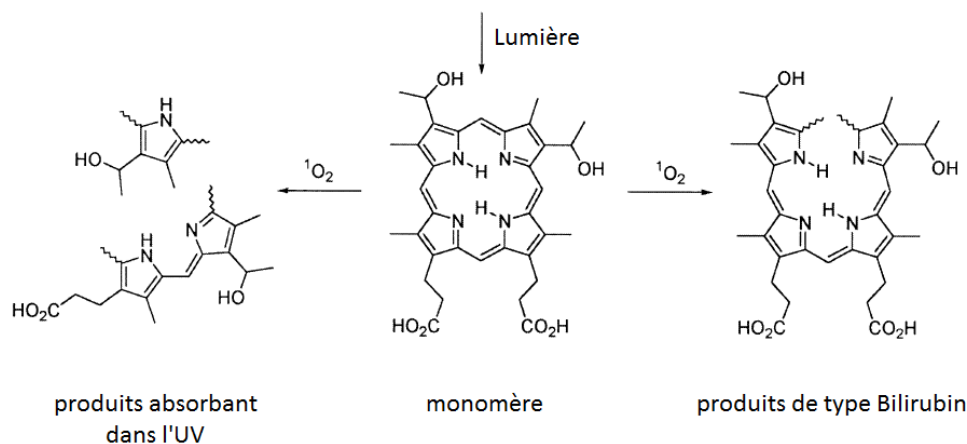
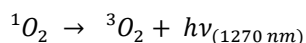
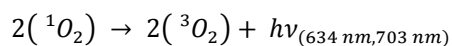


Figure 41 : Mécanisme de Rotomskis de photo-oxydation de l'hématoporphyrine en présence d' $^1O_2$ , adapté de la référence [101].

L' $^1O_2$  possède également des propriétés de chimioluminescence (CL) uniques qui permettent de le détecter lorsqu'il se désexcite. Il peut réagir de deux façons, soit suivant une réaction dimolaire qui émet de la lumière à une longueur d'onde de 634 nm et 703 nm soit suivant une réaction monomolaire dont l'émission se situe à 1270 nm et que l'on va pouvoir mesurer à l'aide d'un spectrofluorimètre infrarouge [32, 137, 138].



Equation 9 : Réaction de désexcitation dimoléculaire de l'oxygène singulet, d'après la référence [32].



Equation 10 : Réaction de désexcitation monomoléculaire de l'oxygène singulet, d'après la référence [32].

Bien qu'il ne soit pas une espèce radicalaire, l' $^1O_2$  possède un caractère électrophile ainsi qu'un faible potentiel redox qui le rend hautement réactif. Ceci lui permet d'engendrer des réactions d'oxydation avec les composés organiques (espèces riches en électrons), sans passer par la formation de radicaux libres durant ces réactions. L'hypothèse qui est retenue à l'heure actuelle est celle proposée en 1964 par Kautsky, Gollnick et Schenck selon laquelle il se forme une version moloxide (pont peroxyde instable) de l' $^1O_2$  par réaction avec les alcènes pour donner des hydroperoxydes allyliques dans lesquels la double liaison se décale [32, 133]. Cette haute réactivité de l'oxygène singulet vis-à-vis des molécules biologiques en fait un agent cytotoxique remarquable [86, 122] dont la durée de vie n'excède pas quelques centaines de nanosecondes ( $\approx 300$  ns) dans une cellule [96, 122, 139, 140]. Il va donc réagir rapidement avec les molécules organiques se trouvant dans son environnement proche (quelques dizaines de nanomètres depuis la source) [96, 141, 142]. Si le PS est a été internalisé dans une cellule avant son irradiation, celui-ci va engendrer une destruction des lysosomes et de la mitochondrie de la cellule par oxydation des lipides, des acides aminés et des acides nucléiques contenus dans l'ADN qui la constitue. Bien que les quatre bases soient susceptibles d'être endommagées, cela se produit préférentiellement avec la guanine [129]. Les acides aminés les plus oxydés par l'oxygène singulet, sans faire de distinction entre les réactions de désexcitation monomoléculaire et dimoléculaire de l' $^1O_2$ , à pH physiologique sont : His, Tyr, Met, Cys, Phe et Trp [129, 138]. Dans le cas d'une production d' $^1O_2$  à l'extérieur de la cellule, l' $^1O_2$  va réagir avec les lipides qui constituent la paroi cellulaire et il va induire des altérations de la perméabilité de cette paroi, ce qui va entraîner la mort des cellules et la destruction des tissus ciblés par apoptose et nécrose (Figure 42) sans endommager les tissus environnants non irradiés [117, 143]. La nécrose et l'apoptose sont les deux mécanismes majeurs de destruction cellulaire. Ils se caractérisent de façons distinctes aussi bien du point

de vue morphologique que du point de vue mécanistique <sup>[144]</sup>. L'induction de l'apoptose est une mort programmée de la cellule caractérisée par la fragmentation de l'ADN en l'absence de rupture de la membrane cellulaire et la perte de la phosphatidylsérine membranaire sans dommage cellulaire (Figure 42). Ce mécanisme de mort cellulaire est fréquemment associé au développement de cellules tumorales résistantes à la thérapie <sup>[144, 145]</sup>. La nécrose est, quant à elle, caractérisée par la désintégration de la membrane cellulaire et la fragmentation cellulaire (Figure 42). Elle peut donc jouer un rôle important dans l'augmentation de la réponse immunitaire contre les tumeurs <sup>[14, 144, 146-153]</sup>.

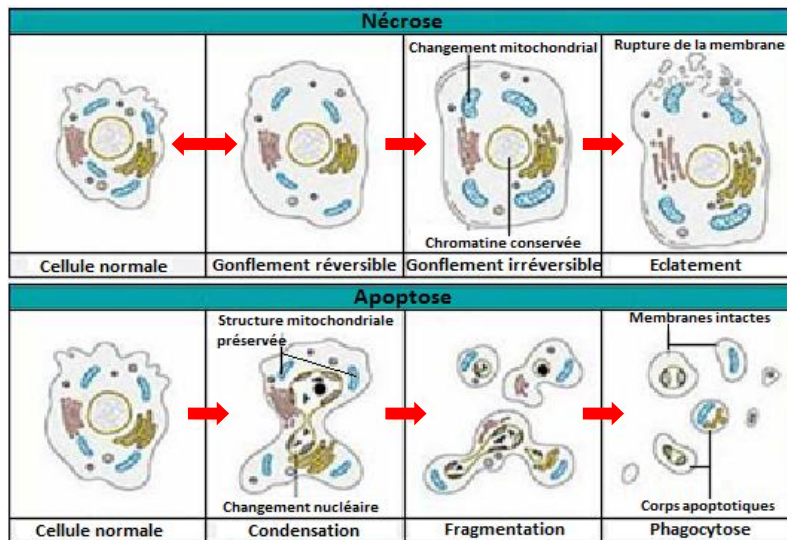


Figure 42 : Schémas des étapes des mécanismes de la nécrose et de l'apoptose cellulaire, adapté des références [154, 155].

### **I. 3. b. Les propriétés photophysiques d'un bon photosensibilisateur**

Malgré le potentiel important de la PDT, celle-ci est utilisée principalement pour le traitement des tumeurs superficielles de faible épaisseur et celles accessibles à la lumière. Cette restriction applicative vient du fait que la pénétration de la lumière dans les tissus est dépendante de la longueur d'onde de celle-ci. En effet, les lumières bleue et verte ne peuvent pas pénétrer à plus de deux millimètres de profondeur sans que l'énergie transmise ne décroisse drastiquement annulant ainsi l'effet photodynamique. La lumière rouge est, quant à elle, caractérisée par une plus grande pénétration des tissus en profondeur de l'ordre du centimètre (Figure 43). Cependant, elle peut être stoppée par des sites de pigmentation comme c'est le cas pour certains mélanomes <sup>[143]</sup>.

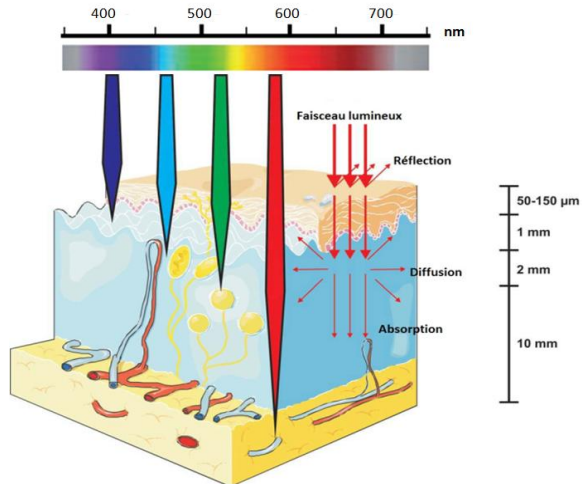


Figure 43 : Profondeur de pénétration de la lumière suivant sa longueur d'onde, adapté de la référence [156].

La lumière visible située entre 400 nm et 700 nm est absorbée par les constituants des tissus vivants qui, en revanche, deviennent relativement transparents au-delà de 700 nm et jusqu'à 1000 nm<sup>[157]</sup>. Par conséquent, l'utilisation d'un rayonnement rouge et/ou NIR permet de s'affranchir en partie de la contrainte de pénétration du faisceau incident dans les tissus (Figure 44). De plus, elle offre une faible dispersion et une faible absorption de l'énergie incidente ce qui permet d'inhiber partiellement ou totalement l'autofluorescence émis par les tissus irradiés mais non ciblés<sup>[158]</sup>. Cependant, il paraît intéressant de noter qu'un PS commercial, le Levulan<sup>®</sup>, est utilisé en thérapie par association avec une excitation dans le bleu<sup>[159]</sup>.

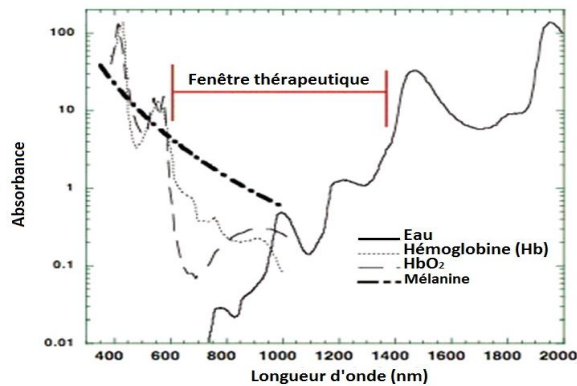


Figure 44 : Spectre d'absorption des composants majoritaires des tissus vivants en fonction de la longueur d'onde d'absorption et du composant considéré, adapté des références [126, 160].

Les chromophores organiques naturellement présents dans le corps pouvant donc être excités dans le spectre UV-visible avec des longueurs d'ondes spécifiques à chacun d'eux, il est nécessaire d'utiliser des sources d'excitation lumineuses adaptées à la fenêtre thérapeutique. Les longueurs d'ondes d'excitation appartenant à ce domaine de transparence des tissus vivants peuvent être obtenues avec des sources laser de type Gallium-Arsenic (GaAs) (Figure 45).

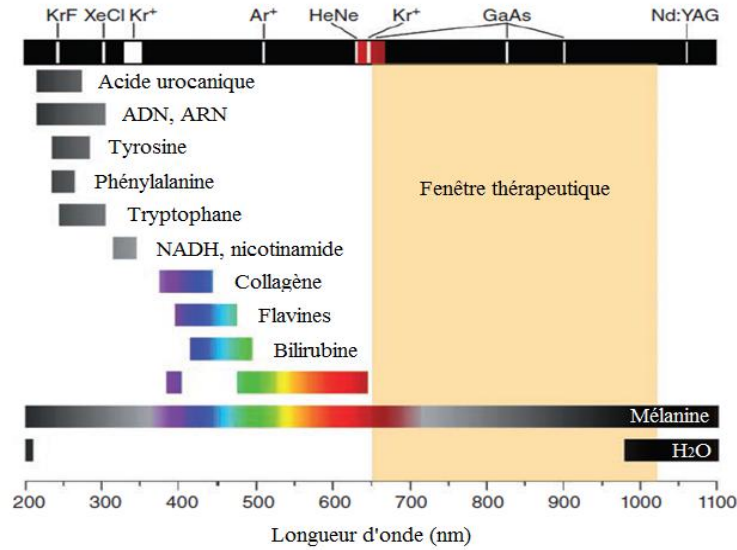


Figure 45 : Domaines d'absorption UV-visible de différentes molécules endogènes et les sources d'excitation correspondantes, adapté de la référence [125].

Le photosensibilisateur devant être excité dans le domaine des longueurs d'onde qui définissent la fenêtre thérapeutique (Figure 46), des modifications chimiques peuvent être effectuées à différents niveaux (chélation d'un métal, ajout de cycles, ajout de chaînes aliphatiques) permettant ainsi d'adapter le spectre d'absorption UV-visible des PS (Figure 46) [161].

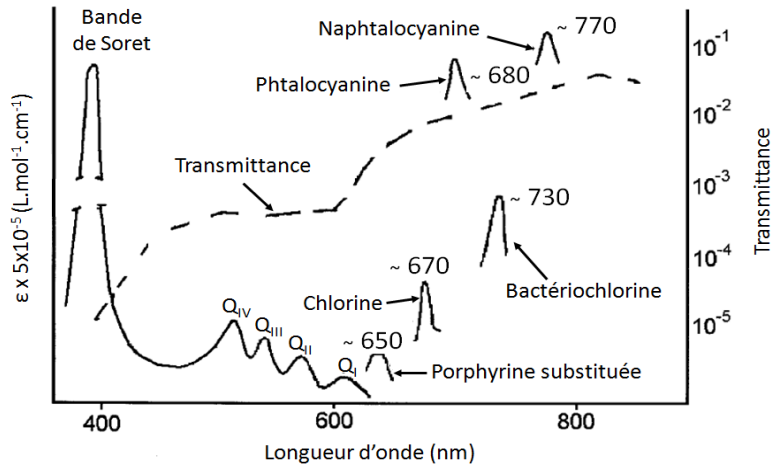


Figure 46 : Spectres d'absorption de différents photosensibilisateurs en comparaison de la transmittance des tissus vivants. Les bandes de Soret, Q<sub>I</sub>, Q<sub>II</sub>, Q<sub>III</sub> et Q<sub>IV</sub> sont celles de la porphyrine. La courbe de transmittance a été obtenue avec un morceau de scrotum (7 mm d'épaisseur), adapté de la référence [86].

Deux paramètres, la puissance du laser et le temps d'irradiation, sont également à prendre en compte pour obtenir la quantité de lumière nécessaire au traitement. Cependant, l'utilisateur est limité par l'effet thermique local. Une puissance trop élevée entraîne une élévation de température non souhaitée qui engendre des variations de l'hémodynamique (ou dynamique du sang) et éventuellement, à plus long terme, le développement de phénomènes inflammatoires qui compliquent les suites opératoires [126].

Un bon photosensibilisateur doit donc posséder les propriétés suivantes :

- Un coefficient d'extinction molaire élevé dans la zone spectrale de l'excitation lumineuse (Equation 11) qui est directement lié au pouvoir photosensibilisant de la molécule. Plus il sera élevé, plus la dose efficace sera faible <sup>[86]</sup>.

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \times L \times C = -\log \frac{I_{\lambda}}{I_{0\lambda}}$$

Equation 11 : Loi de Beer-Lambert.

*A* : absorbance ; *C* : concentration (mol.L<sup>-1</sup>) ; *ε* : coefficient d'extinction molaire (L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) ; *L* : distance entre la source et la molécule à exciter ; *I<sub>λ</sub>/I<sub>0λ</sub>* : transmittance à la longueur d'onde λ.

- Un état triplet d'énergie appropriée ( $E_T \geq 95 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) <sup>[32, 86]</sup> pour permettre un transfert d'énergie efficace vers l'état fondamental de l'oxygène, un rendement quantique de l'état triplet élevé ( $\Phi_T > 0,4$ ), un temps de vie à l'état triplet long ( $\tau_T > 1 \mu\text{s}$ ) (Figure 36) et une bonne photo-stabilité <sup>[86, 126]</sup>.

D'un point de vue biologique, il doit <sup>[29]</sup>:

- Posséder une balance hydrophile/hydrophobe compatible avec une injection intra-veineuse et une incorporation cellulaire,
- Être non toxique en l'absence de lumière,
- Présenter une accumulation préférentielle dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains. Les tumeurs accumulent environ trois fois plus de Photofrin<sup>®</sup> que les tissus normaux correspondants <sup>[29]</sup>. Cette valeur est une moyenne et varie en fonction du tissu, de l'intervalle dose-lumière (IDL) et du type de photosensibilisateur. De ceci découle deux paramètres importants qui sont : l'intervalle de temps entre l'injection et l'illumination ainsi que la durée d'illumination.
- Avoir une clairance rapide, ce qui correspond à un temps de demi-vie d'élimination faible. La clairance correspond à la capacité d'un tissu à éliminer une molécule en fonction du temps (Equation 12). On distingue deux types de produits : les produits à longue demi-vie ( $T_{1/2} > 24\text{H}$ ) qui sont les plus anciens (Photofrin<sup>®</sup>, Foscan<sup>®</sup>) et les produits à courte demi-vie qui sont plus récents (Gliolan<sup>®</sup>, Metvix<sup>®</sup>, Visudyne<sup>®</sup>) et qui permettent une plus grande souplesse de traitement <sup>[126]</sup>.

$$C_{(t)} = C_0 \times e^{-K_e \times t}$$

Equation 12 : Equation reliant la concentration en une molécule en fonction du temps et de sa constante d'élimination, d'après la référence [126].

*C<sub>0</sub>* : concentration à *t* = 0 ; *clairance* : capacité d'un tissu à éliminer une substance (mL.min<sup>-1</sup>) ; *V<sub>d</sub>* : volume de distribution (mL) ; *K<sub>e</sub>* : constante apparente d'élimination = clairance/*V<sub>d</sub>*.

## I. 4. Les 4 générations de photosensibilisateurs

### I. 4. a. Première génération

Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe « II. 1. a. ii. », le Photofrin<sup>®</sup> (formes I et II) constitue la première génération de PS et il sera le seul à être utilisé cliniquement entre 1993 et 2000. Malgré les inconvénients qu'il présente (mélange d'oligomères, mauvaise clairance, spectre d'absorption non



optimum au-delà de 600 nm). Afin d'améliorer l'efficacité des photosensibilisateurs, une nouvelle classe de PS a été développée par les chimistes, constituées de molécules entièrement synthétiques, aux propriétés photophysiques adaptées au type de cancer ciblé et de clairance plus rapide. Ce sont les photosensibilisateurs de 2<sup>ème</sup> génération.

## I. 4. b. Deuxième génération

### I. 4. b. i. La structure chimique

La classe de photosensibilisateurs la plus importante pour la PDT concerne celle des porphyrines et de leurs dérivés chlorines et bactériochlorines. L'architecture principale de base de ces composés porphyriniques utilisés comme PS ne montre que peu de différences structurales entre chacune d'elle (Figure 47).

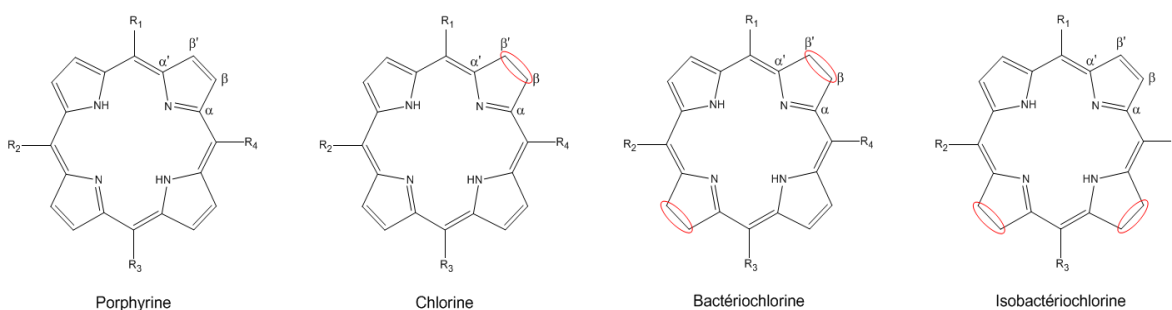


Figure 47 : Structures chimiques des squelettes de quatre composés porphyriniques.

Ce sont des systèmes aromatiques dont l'aromaticité est due à un système cyclique à 18 électrons obéissant à la règle de Hückel des  $(4n+2) e^-$  et possédant une énergie de stabilisation par résonance d'environ  $1200 \text{ kJ.mol}^{-1}$  [32]. Elles sont constituées d'un macrocycle à 20 atomes de carbone d'une largeur de 8,8 Å, avec un espace interne d'environ 4,2 Å entre deux atomes d'azote opposés (Figure 48). Les distances, en diagonales, séparant les atomes d'azote sont presque équivalentes. Elles ont été évaluées à 4,163 Å pour  $N_1-N_3$  et 4,060 Å pour  $N_2-N_4$ . La longueur des liaisons N-H intérieures a été évaluée à 1,028 Å ( $\pm 0,16$  Å) et celle entre les deux atomes d'hydrogènes intérieurs a été évaluée à 2,107 Å. Du fait de la symétrie  $D_{2h}$  des porphyrines base libre, les liaisons entre les atomes de carbones varient plus fortement et mesurent, quant à elles, entre 1,380 Å et 1,456 Å [162].

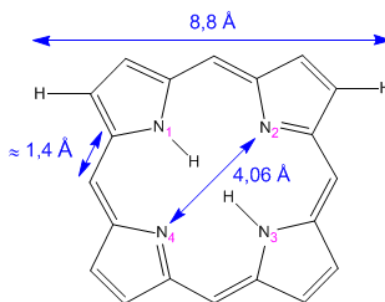


Figure 48 : Schéma indiquant la taille du cycle porphyrinique, adapté de la référence [32].

Plus généralement, les porphyrines et les molécules dérivées de porphyrines utilisées en PDT se différencient au niveau des substituants situés sur les positions pyrroliques périphériques du macrocycle ou encore sur leurs quatre carbones méthine (positions *méso*).



## I. 4. b. ii. La nomenclature

Afin de rendre la lecture du squelette des porphyrines plus facile, un système de nomenclature a été développé par Fischer dans les années 1930. Il distingue les carbones pyrroliques, dont les parties liées sont dites  $\alpha$ -pyrroliques et les parties libres sont notées  $\beta$ -pyrroliques et notées de 1 à 8, et les carbones des positions méthines sont dits « *méso* » et notés  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ . En 1987, une nomenclature systématique du macrocycle (IUPAC) a été adoptée, les carbones des positions « *méso* » sont indexés 5, 10, 15 et 20, les azotes sont numérotés 21, 22, 23 et 24<sup>[163]</sup> et les noyaux pyrroles sont nommés A, B, C, D (Figure 49).

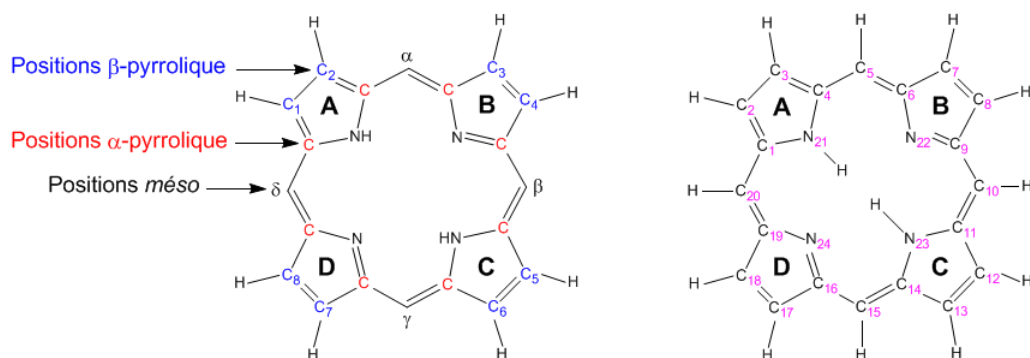


Figure 49 : Nomenclature du macrocycle avec la numérotation de Fischer (à gauche) et la numérotation IUPAC (à droite), d'après les références [163-165].

Les porphyrines base libre présentent plusieurs formes tautomères qui sont dues aux échanges des protons aux niveaux des liaisons N-H mais qui ne sont pas observables en RMN à température ambiante du fait de leur échange trop rapide. Ce phénomène a été mentionné pour la première fois, en 1961, par Becker et al.<sup>[166, 167]</sup>. De plus, la présence de groupements volumineux en position « *méso* », tels que les groupements phényles, créent des encombrements stériques<sup>[124]</sup> au niveau des hydrogènes situés aux positions  $\beta$ -pyrroliques. Ces interactions sont diminuées par l'intermédiaire d'une orientation la plus favorable possible de ces groupements.

## I. 4. b. iii. Les propriétés photophysiques des porphyrines

### • Propriétés spectrales d'absorption UV-visible

La provenance des bandes d'absorption UV-visible des porphyrines a été décrite dans les années 1960 par Gouterman suivant son modèle des quatre orbitales moléculaires (« *Gouterman four orbitals model* »)<sup>[168]</sup>. Ce spectre d'absorption électronique est composé d'une bande typique très intense qui s'étend de 400 à 430 nm, appelée bande de Soret (ou bande B)<sup>[32]</sup>, qui est d'autant plus fine que la porphyrine est pure et se trouve sous forme non agrégée. Cette bande est constituée de deux bandes  $B_x$  et  $B_y$  confondues<sup>[32]</sup>. Elle est suivie de quatre autres bandes réparties entre 480 et 700 nm appelées bandes Q (I, II, III, IV) d'intensités beaucoup plus faibles (dix à vingt fois plus faible que la bande principale). Les bandes Q des porphyrines libres sont constituées de quatre pics d'absorption qui sont typiquement des transitions  $Q_x(0,0)$ ,  $Q_x(0,1)$ ,  $Q_y(0,0)$ ,  $Q_y(0,1)$  opérant dans les porphyrines monomériques (symétrie  $D_{2h}$ ). Ces bandes situées entre 415 et 650 nm possèdent une intensité variable. La bande de Soret provient d'une forte transition électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$  de l'état fondamental vers le second état excité ( $S_0 \rightarrow S_2$ ). Cette transition est permise selon la règle de Laporte, ce qui explique le coefficient d'absorption molaire élevé de cette bande d'absorption ( $\epsilon \approx 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Les bandes Q, quant à elles, proviennent d'une transition électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$  de faible probabilité vers le premier état excité ( $S_0 \rightarrow S_1$ ). Ces transitions électroniques sont possibles parce que les substitutions périphériques

n'interagissent pas significativement avec les électrons  $\pi$  des cycles internes des macrocycles porphyriniques qui sont responsables des transitions électroniques actives du domaine spectral UV-visible des PS (transitions électroniques  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) [32]. D'un point de vue physique, cela s'explique par le fait que le nombre et l'intensité des bandes Q dépendent du degré de symétrie du macrocycle de la porphyrine.

Selon le modèle de Gouterman [32], une porphyrine base libre, neutre est comparable à un système à 18 centres et 18 électrons, de symétrie  $D_{2h}$  ce qui implique que les directions x et y sont différenciées. A chaque transition électronique entre les états  $S_0$  et  $S_1$  correspondent deux bandes d'absorption, il existe alors deux états électroniques distincts qui conduisent la formation de quatre bandes Q observables. En revanche, une porphyrine métallée ou diprotonnée correspond à un système à 16 centres et à 18 électrons de symétrie  $D_{4h}$ . Dans ce cas, les directions x et y sont équivalentes et les niveaux énergétiques sont dégénérés. Ce type de porphyrine possédant un degré de symétrie plus élevée ( $D_{4h}$ ), les quatre bandes présentes pour une porphyrine de symétrie  $D_{2h}$  sont donc associées deux à deux. Ceci conduit à la modification du spectre d'absorption UV-visible qui ne comporte alors plus que deux bandes Q(0,0) et Q(0,1).

Afin de classer les porphyrines en fonction de leur spectre d'absorption UV-visible, une nomenclature des bandes d'absorption UV-visible de ces composés a été établie en 1956 par Platt, les répartissant ainsi en plusieurs bandes d'absorption [32]. De plus, un classement empirique en 4 types a été établi afin de distinguer ces molécules en fonction du rapport d'intensité entre les différentes bandes Q. Les bandes Q sont sensibles à la nature des substituants du macrocycle et peuvent se présenter de quatre façons différentes: éthio, rhodo, oxorhodo et phyllo [165] (Figure 50).

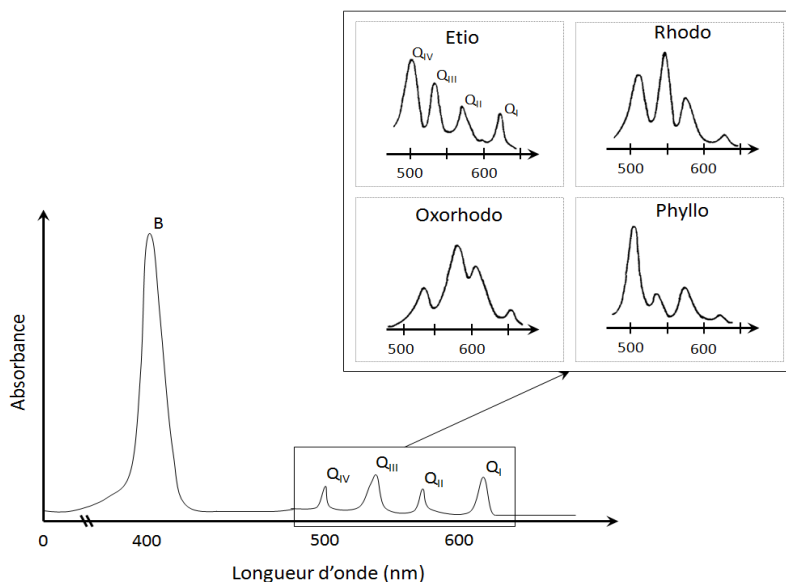


Figure 50 : Spectres d'absorption UV-visible caractéristiques des différents types de porphyrines, adapté de la référence [165].

Suite à la complexation d'une porphyrine avec un ion métallique, le nombre de bandes Q décroît du fait de l'augmentation de symétrie moléculaire de  $D_{2h}$  à  $D_{4h}$ . Le spectre d'absorption UV-visible comporte alors la bande B et uniquement deux bandes nommées  $\alpha$  et  $\beta$  [32].

Les chlorines présentent une bande d'absorption  $Q_I$ , aux alentours de 650 nm, qui est environ 3 fois plus intense que celle des porphyrines. Les bactériochlorines, quant à elles, ont une bande  $Q_I$  10 fois plus intense que celle des porphyrines et décalée vers 750 nm. L'absorption importante des chlorines à 650 nm peut être intéressante pour la PDT [32] (Figure 51).

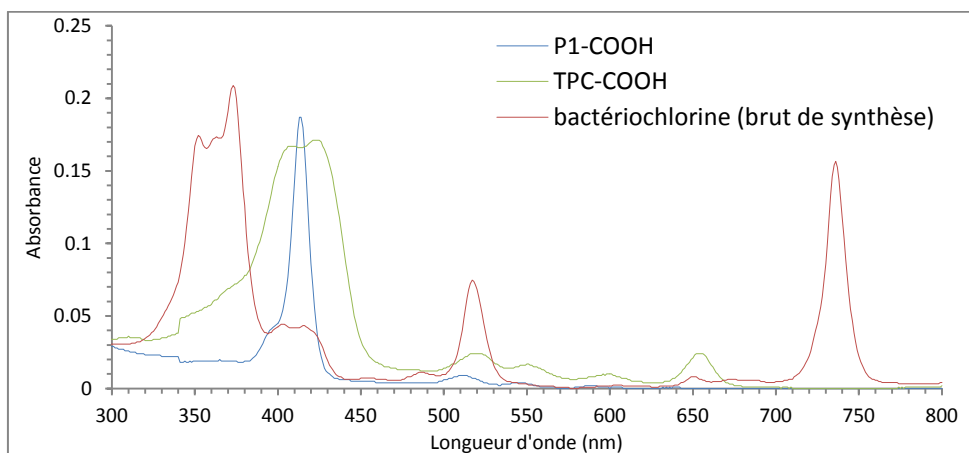


Figure 51 : Spectres d'absorption UV-visible d'une porphyrine (5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl-21,23-porphyrine) et de ses formes bactérochlorine et chlorine dans l'EtOH.

Plus généralement, les molécules de type porphyrine ont une large échelle d'absorption allée à de fortes valeurs de coefficients d'absorption molaire (Figure 52).

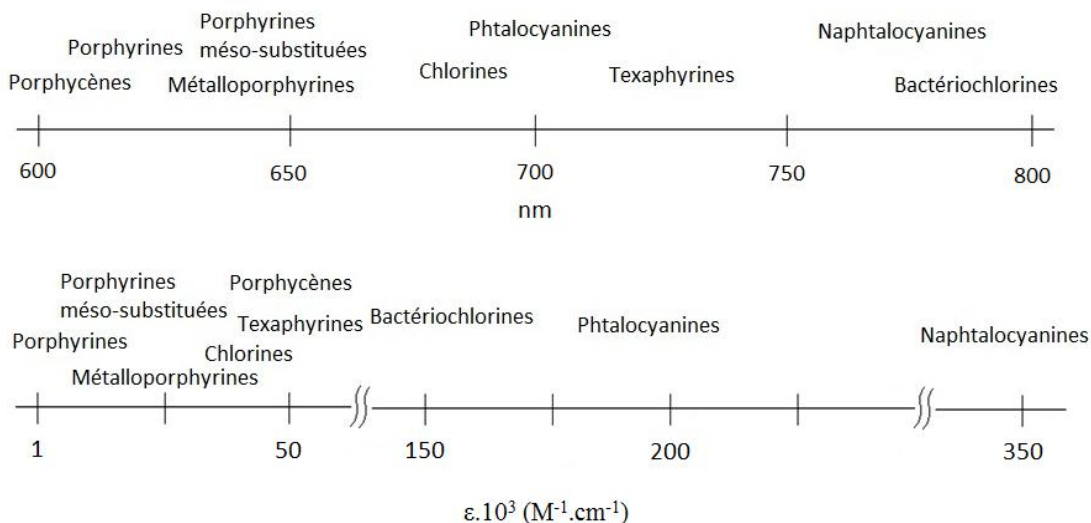


Figure 52 : Echelle des coefficients d'absorption maximum de différents photosensibilisateurs en fonction de leur longueur d'onde d'absorption UV-visible utile en PDT, adaptée de la référence [169].

#### I. 4. b. iv. Synthèse des porphyrines

Les stratégies de synthèse mises en place ont majoritairement visé à contrôler la nature des substituants des positions  $\beta$ -pyrroliques et des positions « *méso* ». Nous ne nous intéresserons ici qu'aux porphyrines *méso* substituées. Cette synthèse peut se faire soit en une étape par oxydation directe des porphyrinogènes par l'oxygène de l'air soit en deux étapes par ajout d'un agent oxydant en conditions

inertes <sup>[170]</sup>. Il existe plusieurs méthodes de synthèse qui permettent d'obtenir les porphyrines et les principales sont recensées ci-dessous.

### • Synthèse par condensation du pyrrole et d'aldéhyde

#### - Synthèse de Fischer

Fischer et Gleim ont été les premiers à obtenir une porphyrine par synthèse chimique. Ils l'ont obtenu par condensation du pyrrole et d'un aldéhyde sous reflux d'acide méthanoïque. Les rendements obtenus sont de 0,2 à 20% <sup>[171]</sup>.

#### - Synthèse de Rothmund

La première synthèse de porphyrines substituées en position « *méso* » a été décrite par Rothmund en 1935 <sup>[172]</sup>. Il a obtenu cette molécule en faisant réagir l'acétaldéhyde et le pyrrole dans le méthanol à différentes températures, dans de la verrerie scellée, pour éviter les pertes d'acétaldéhyde. Lors d'une autre synthèse, il a chauffé, à 90-95°C pendant 30 heures, une solution contenant ~ 0,44 M de pyrrole et ~ 0,58 M de formaldéhyde dans le MeOH sous N<sub>2</sub> (dans une verrerie scellée) et a obtenu un rendement faible de 0,9%. Il a ensuite recommencé l'opération en faisant réagir différents aldéhydes à 140-150°C pendant 24 heures, ce qui a permis d'obtenir des porphyrines portant différents substituants *méso* (méthyle, propyle, butyle, isobutyle, phényle, 3-méthoxy-4-hydroxyphényle, 2-hydroxyphényle, 3-hydroxyphényle, 4-méthoxyphényle) <sup>[34, 173, 174]</sup>. Les chlorines (10-20%) obtenues lors de la synthèse ont été ensuite réduites en la porphyrine correspondante par la DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyanoquinone) <sup>[173, 175]</sup> (Figure 53). En 1941, il détailla la première synthèse de *méso*-tétraphénylporphyrine (TPP) par une réaction dans un milieu concentré à haute température en absence d'agents oxydants. Pour cela, il a chauffé 10 mL de pyrrole (3,6 M) et 20 mL de benzaldéhyde (4,9 mL) dans 20 mL de pyridine dans un tube scellé à 220 °C pendant 48 heures. Il a ensuite refroidi lentement le milieu réactionnel ce qui lui a donné la porphyrine désirée (cristaux bleus luisants en forme d'aiguilles) avec un rendement de 7,5 à 9% <sup>[34, 164, 176]</sup>. En 1946, Calvin et al. ont découvert que l'addition d'un sel métallique (ex : acétate de zinc) dans le mélange réactionnel de cette synthèse augmente le rendement de synthèse de la porphyrine base libre de 4-5% et diminue le taux de chlorine formée lors de la réaction. Cet ajout leur a également permis d'obtenir la *méso*-tétraphénylporphyrine métallée par du zinc avec un rendement proche de 11%. Tous produits confondus, le rendement total en TPP (TPP + TPP(Zn)) de cette synthèse atteignait donc 20%, ce qui est deux fois plus élevé que les rendements précédents <sup>[164, 177]</sup>.

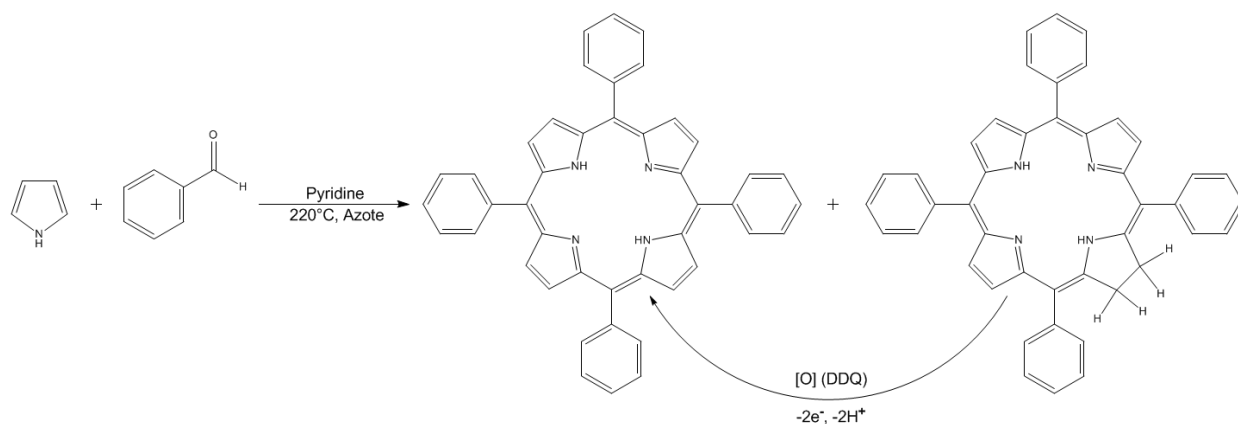


Figure 53 : Réaction de la synthèse de la TPP effectuée par Rothmund, adaptée de la référence [164].

### - Synthèse de Adler et Longo

En 1967, Adler et Longo ont synthétisé la TPP par condensation de pyrrole et de benzaldéhyde en milieu acide à reflux pendant 30 minutes dans un réacteur ouvert <sup>[178]</sup>. Ils ont effectué cette synthèse en utilisant différents acides (acide acétique avec ou sans sel métallique, acide chloroacétique, acide trifluoroacétique, acide propionique). L'intermédiaire réactionnel a été ensuite oxydé par l'O<sub>2</sub>, ce qui a permis d'obtenir la conjugaison entière du macrocycle par la perte des atomes d'hydrogène situés en positions *méso*. Cependant, cette méthode produit en moyenne 2 à 10% de chlorure qui doit ensuite être convertie en la porphyrine correspondante par oxydation avec de la DDQ dans du toluène à reflux <sup>[175]</sup> (Figure 54). Cette synthèse permet d'obtenir la TPP avec un rendement de 20%, avec une plus faible quantité de chlorure formée, et dans des conditions de réaction plus douces par rapport à celles de Rothemund permettant ainsi l'utilisation d'une grande variété de substituants pour les positions *méso* <sup>[164]</sup>. En utilisant l'acide éthanoïque à la place de l'acide propionique, ils ont obtenu un rendement de synthèse de l'ordre de 40% <sup>[173, 174]</sup>.

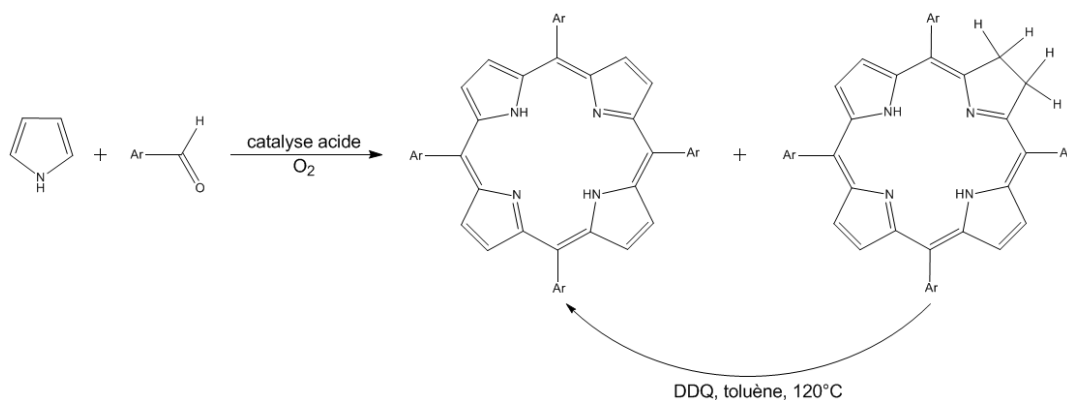


Figure 54 : Schéma de synthèse d'une tétraarylporphyrine suivant la méthode de Adler, adapté de la référence [175].

Par la suite, Rocha Gonsalves et al. ont mis au point un procédé de synthèse en deux étapes qui consistait à condenser du pyrrole et des aldéhydes aliphatiques dans le CCl<sub>4</sub> en présence de TFA à 60°C. L'oxydation de l'intermédiaire porphyrinogène se faisait par ajout de DDQ ou de *p*-chloranil. Ils ont également démontré qu'il est possible de préparer la *méso*-tétraarylporphyrine sans formation de chlorure par un procédé à une seule étape. Pour cela, ils ont fait réagir du pyrrole et des aldéhydes dans un mélange d'acide (acide acétique ou propionique) avec 30% de nitrobenzène, à 120°C sous air. Ce procédé leur a permis d'obtenir de la porphyrine exempte de chlorure <sup>[175]</sup>.

### - Synthèse des « aldéhydes mixtes » (ou synthèse de Little)

En 1975, Little a utilisé la méthode dite des « aldéhydes mixtes » pour synthétiser une série de *méso*-tétraarylporphyrines non symétriques <sup>[179]</sup>. Elle consiste à faire réagir du pyrrole avec un mélange d'aldéhydes en quantités stœchiométriques dans de l'acide propionique à reflux pendant 30 minutes (Figure 55). Il a également utilisé l'acide et l'anhydride acétique afin de produire des porphyrines à partir de 27 mélanges différents d'aldéhydes <sup>[34]</sup>.

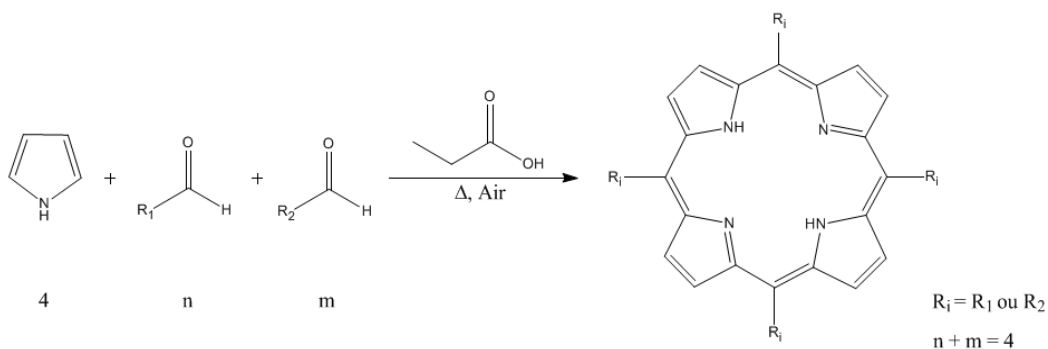


Figure 55 : Synthèse d'une porphyrine *méso*-tétrasubstituée par la méthode des « aldéhydes mixtes » catalysée à l'acide propionique, d'après la référence [179].

Cette méthode présente l'inconvénient de ne pas permettre le contrôle de la distribution des substituants ce qui donne un brut réactionnel constitué d'un mélange d'isomères de positions. A partir d'un mélange d'aldéhydes portant les fonctions A et B, on obtient les six porphyrines suivantes :  $A_4$ ,  $B_4$  dites porphyrines parentes et les porphyrines hybrides :  $A_3B$ ,  $AB_3$ , *cis*- $A_2B_2$  et *trans*- $A_2B_2$  avec des distributions statistiques suivant le ratio d'aldéhydes utilisés<sup>[34]</sup> (Figure 56).

La production d'une porphyrine de type ( $A_3B$ ) se limite généralement à 5% de rendement environ pour un total de 20%<sup>[34, 175, 179, 180]</sup>. Des proportions plus élevées en A favorise la formation de porphyrine  $A_4$  et diminue la formation de  $A_3B$ <sup>[34]</sup>.

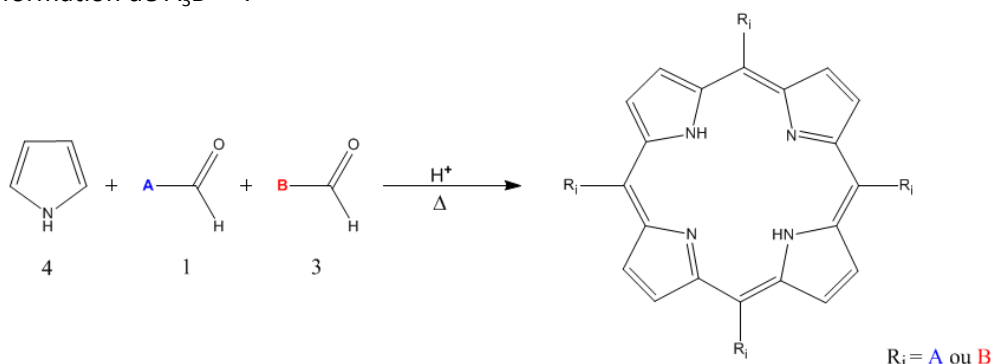


Figure 56 : Réaction de synthèse d'une porphyrine par la méthode des "aldéhydes mixtes", adapté de la référence [34].

### - Synthèse de Lindsey

En 1986, à partir de la synthèse de Rothmund<sup>[181]</sup>, Lindsey a mis au point un protocole qui consiste à remplacer l'acide propionique par un acide de Lewis ( $BF_3 \cdot OEt_2$  ou  $BCl_3$ ) en quantité catalytique<sup>[175]</sup>. Cette réaction s'effectue dans le dichlorométhane anhydre ( $CH_2Cl_2$ ) à reflux en présence d'un capteur d'eau ou « *water scavenger* » (TEOA pour *triethyl orthoacetate* dans le cas de l'utilisation du  $BF_3 \cdot OEt_2$ ) sous  $N_2$ <sup>[174]</sup>. Dans ce procédé en deux étapes, la phase d'oxydation de l'intermédiaire porphyrinogène est assurée par une quinone : la DDQ ou le *p*-chloranil<sup>[174]</sup>. Cette synthèse permet l'obtention de la TPP avec un rendement de 46% (Figure 57). Cette méthode est réalisée dans des conditions douces, ce qui permet l'utilisation d'une plus grande variété d'aldéhydes, même peu stables. Cependant, cette méthode est très dépendante des conditions opératoires (type de solvant, type catalyseur de condensation et d'oxydation, structure chimique des substrats, anaérobie) de plus, le rendement optimum n'est atteint que pour des solutions très diluées ( $C < 10^{-2}$  M). Cette méthode est également utilisée pour la synthèse de porphyrines asymétriques, avec les réactifs introduits en quantités stœchiométriques et elle permet d'obtenir des rendements supérieurs à ceux obtenus avec les méthodes précédentes. Notre équipe

utilise ce protocole dans la synthèse d'une porphyrine asymétrique (la P<sub>1</sub>-COOH) dont le protocole exact sera détaillé dans la partie expérimentale. Dans cette synthèse, nous utilisons comme acide de Lewis le trifluoroborate étherate (BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub>)<sup>[182]</sup> et comme agent réducteur une autre quinone : le *p*-chloranil (2,3,5,6-tétrachlorobenzoquinone)<sup>[173]</sup>. D'autres types de catalyseurs comme le In(OTf)<sub>3</sub> (triflate d'indium) sont utilisables et ils permettent d'avoir des conditions de synthèses encore plus douces<sup>[167]</sup>.

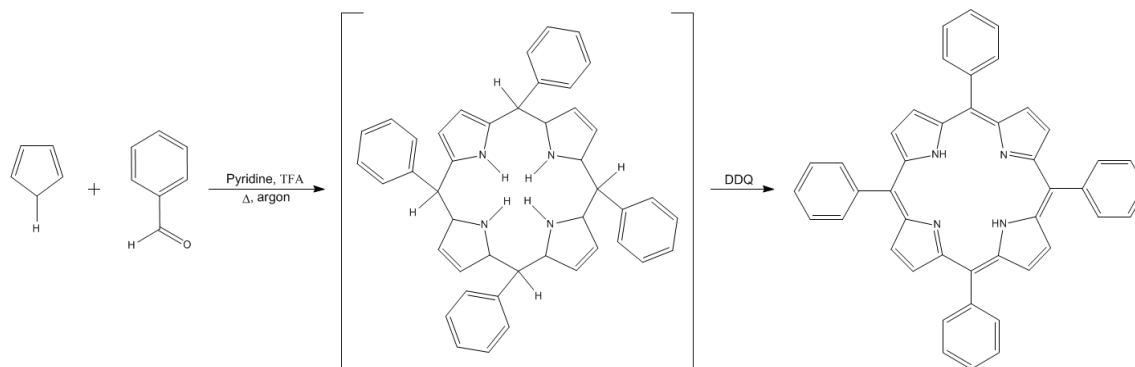


Figure 57 : Synthèse d'une porphyrine tétra-*méso*-substituée suivant la méthode de Lindsey, d'après la référence [34].

Cette méthode a ensuite été utilisée pour la condensation de pyrrole avec différents aldéhydes ainsi que des mélanges d'aldéhydes. Elle a également servi à l'élaboration d'un procédé de synthèse de porphyrine sur phase solide<sup>[175]</sup>.

#### - Synthèse sur phase solide

Afin d'augmenter la sélectivité dans les substitutions *méso* et pour faciliter la purification du produit de désiré, un protocole de synthèse de porphyrine asymétrique sur phase solide a été proposé en 1978 par Leznoff et Svirskaya<sup>[183]</sup>. Ils ont utilisé un copolymère de polystyrène-divinylbenzène greffé avec des groupements chlorure de benzoyle traité avec de l'hydroxybenzaldéhyde pour avoir un polymère portant les fonctions benzoylbenzaldéhyde. Cette résine a ensuite été traitée avec du *p*-toluènealdéhyde et du pyrrole dans l'acide propionique chaud pendant 1 heure. Le produit obtenu a ensuite été traité avec du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans le MeOH pendant 24 heures ce qui a permis d'obtenir la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (Figure 58). Cette méthode est plus économique et plus rapide que la synthèse aux aldéhydes mixtes cependant, les porphyrines monosubstituées sont obtenues avec un rendement de seulement 2 à 4,5% (4,5% dans le cas de la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-tritolylporphyrine)<sup>[183]</sup>.

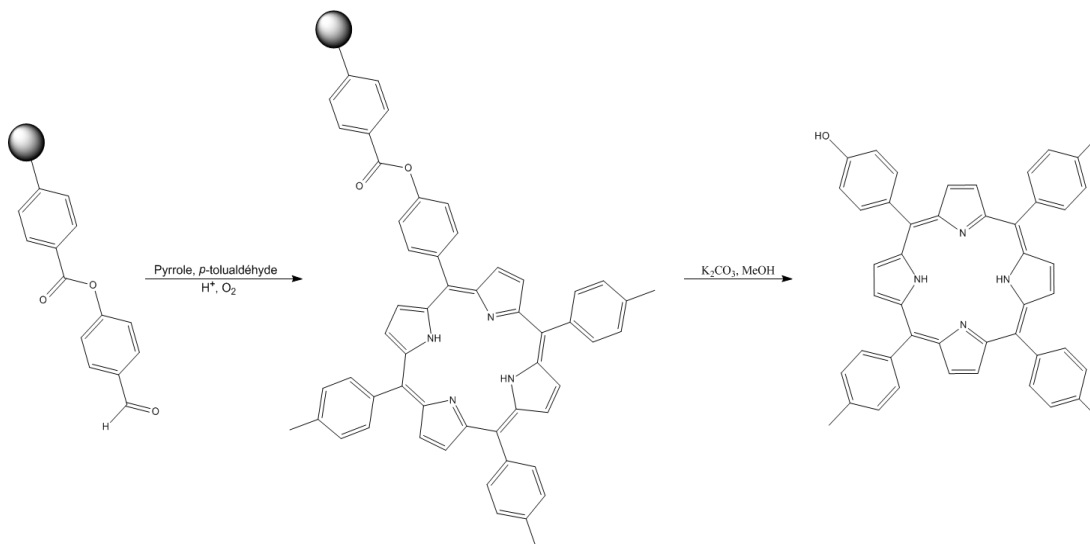


Figure 58 : Synthèse sur phase solide d'une porphyrine monohydroxysubstituée, adaptée des références [34, 183].

### • Synthèse à partir de pyrroles-carbinol

Parallèlement, Lindsey a développé une méthode de synthèse à partir de pyrroles-carbinol. Elle consiste classiquement à traiter une molécule de pyrrole avec une cétone afin d'obtenir une cétopyrrole qui sera ensuite convertie en pyrrole-carbinol désiré (Figure 59). Cette molécule est ensuite mise à réagir à chaud avec un acide en présence d'air pour former la porphyrine *méso*-substituée correspondante (Figure 59). Cette méthode a permis d'obtenir la TPP avec un rendement de synthèse de 41% dans l'acide propionique [34].

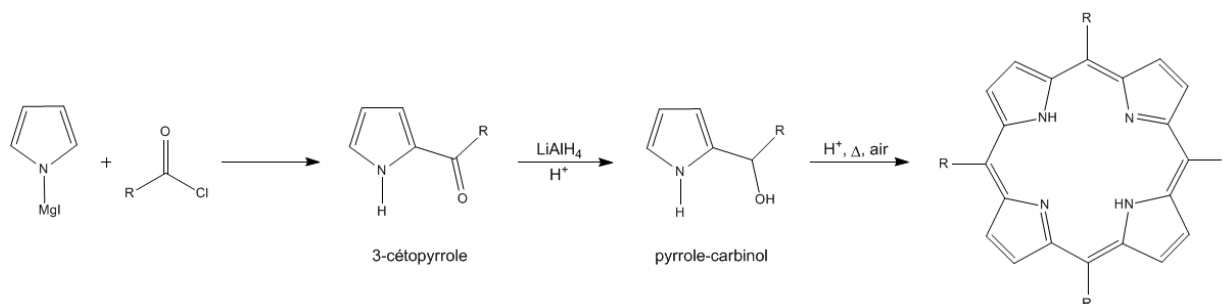


Figure 59 : Synthèse d'une porphyrine à partir d'une méthode de synthèse de pyrrole-carbinol, adapté de la référence [34].

Cependant, en pratique, il existe de nombreuses réactions secondaires pouvant interférer avec la formation du macrocycle comme la polymérisation du pyrrole, la formation d'enchaînements chaotiques de motifs pyrrole et aldéhyde, la formation de chaînes non cyclisées qui diminuent le rendement de synthèse et qui compliquent des phases de purification chromatographiques du produit désiré obtenu. D'autres méthodes ont donc été développées pour remédier à ces problèmes.



• **Synthèse « 2+2 » (couplage direct d'intermédiaires dipyrrole)**

Cette méthode consiste à synthétiser le macrocycle à partir d'un intermédiaire (dipyrrométhane ou dipyrrométhènes). Les intermédiaires sont synthétisés à partir de monopyrrole puis ils sont assemblés pour former le macrocycle porphyrinoïque (Figure 60). Cette réaction permet d'atteindre des rendements de synthèse élevés (de l'ordre de 50 à 60 %) et elle est la plus indiquée pour la formation de porphyrines portant des groupes fonctionnels en position  $\alpha$ .

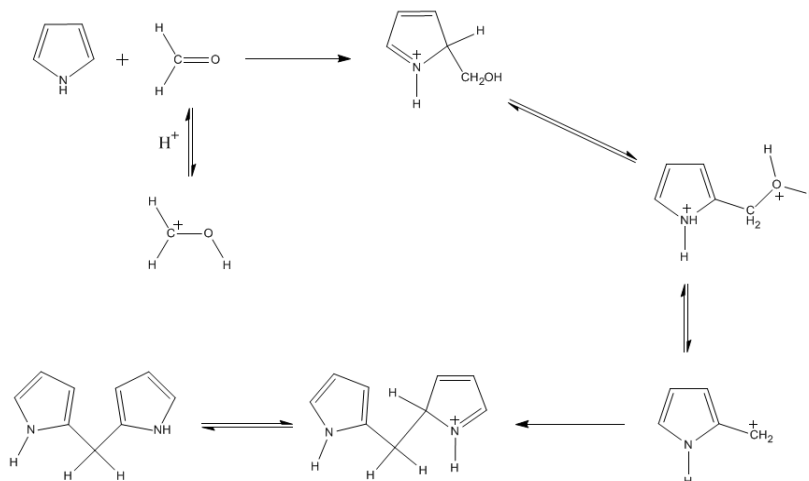


Figure 60 : Réaction de synthèse d'un dipyrrométhane, adapté de la référence [173].

Plusieurs types de catalyses peuvent être utilisés (Tableau 3).

Tableau 3 : Quelques autres types de catalyses utilisées pour la synthèse de porphyrines.

Type de catalyse (réactifs)	Références
SnCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	[184]
HCl, H <sub>2</sub> O	[185]
TFA, InCl <sub>3</sub>	[186]
Iode	[187, 188]
BF <sub>3</sub> OEt <sub>2</sub>	[189]
TFA	[190, 191]

- **La synthèse à partir des dipyrrométhanes (synthèse de Woodward et MacDonald)**

Elle a été développée indépendamment par Woodward et MacDonald, au début des années 1960, qui furent les premiers à synthétiser des porphyrines à partir de deux entités dipyrrométhanes<sup>[192-194]</sup>. Ces dipyrrométhanes sont le produit de la réaction de condensation entre deux unités pyrrole et un aldéhyde, sous catalyse acide, ce qui permet de créer une multitude de synthons possédant des fonctions différentes suivant les réactifs utilisés<sup>[195]</sup> (Figure 61). Lors de cette réaction, il se forme un intermédiaire porphyrinogène qui est ensuite oxydé à l'air pour donner la porphyrine correspondante. Cette méthode, dite « 2+2 », permet donc d'obtenir facilement des porphyrines asymétriques. Elle permet également de synthétiser des porphyrines comportant autant de groupements fonctionnels différents qu'il est possible de mettre sur le macrocycle. Cette méthode a été très utilisée pour la synthèse de porphyrines asymétriques possédant des substituants  $\beta$ <sup>[173]</sup>. MacDonald et al. ont montré que la condensation de 5,5'-diformyldipyrrométhanes avec des dipyrrométhanes 5,5' non substitués, permettait d'obtenir une porphyrine unique avec un rendement de synthèse de 50 à 60%. De plus, les purifications effectuées à chaque étape de synthèse simplifient la purification finale de la porphyrine

obtenue <sup>[173]</sup>. Cependant, cette méthode n'est utilisable que pour synthétiser des dipyrrométhanés symétrique <sup>[171]</sup>.

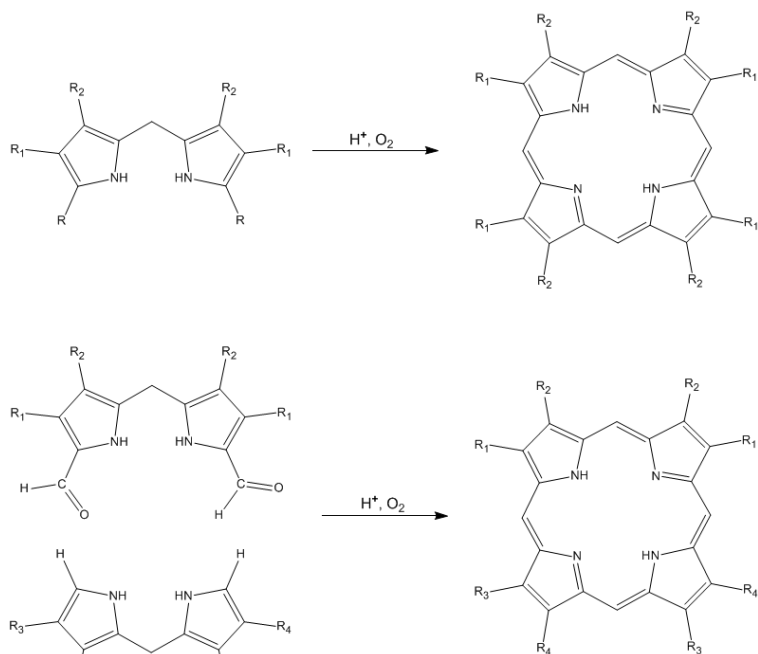


Figure 61 : Schéma de synthèse de Woodward et MacDonald, adapté de la référence [171].

Une variante de cette méthode a été développée par Ogoshi et al., qui mentionnent l'utilisation de dipyrrométhanés et de phényle portant une fonction aldéhyde. Lawrence et al. ont rapporté la synthèse d'une porphyrine par condensation de dipyrrométhanés et de benzaldéhyde dans le dichlorométhane à température ambiante en présence d'une catalyse acide (TFA). Lors de cette réaction, le porphyrinogène est oxydé avec du *p*-chloranil <sup>[173]</sup> (Figure 62).

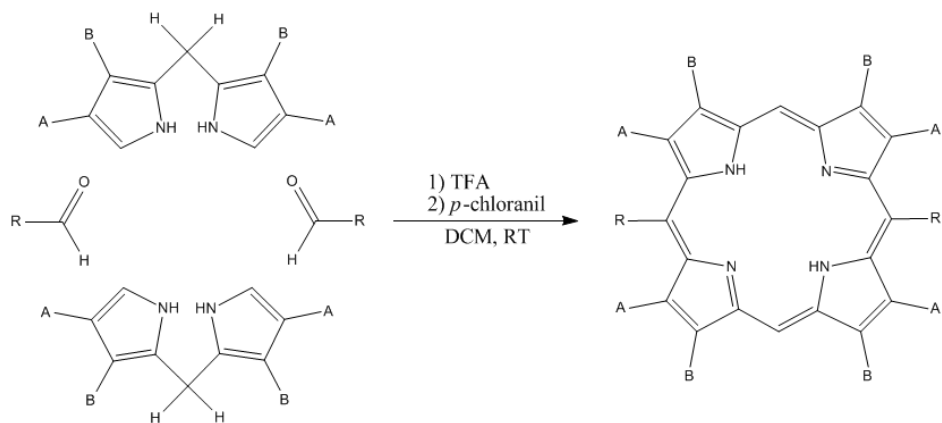


Figure 62 : Schéma de la synthèse de Ogoshi, adapté de la référence [173].

Une autre stratégie, enfin, consiste à constituer un noyau tétrapyrrolique et d'y insérer les groupements désirés aux positions « *méso* ». La réactivité des positions « *méso* » du macrocycle permet en effet l'halogénéation de ces positions qui peuvent servir de support à des réactions de type Suzuki <sup>[196]</sup> (Figure 63).

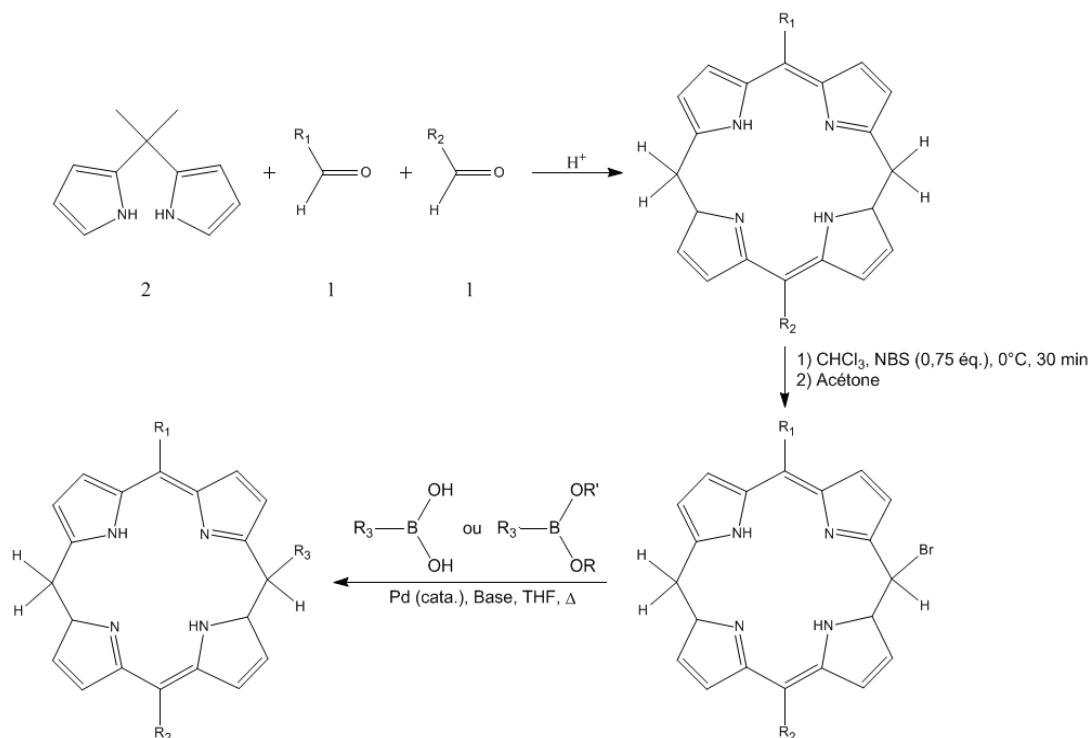


Figure 63 : Schéma de la synthèse d'une porphyrine *méso*-substituée par l'intermédiaire de la réaction de Suzuki, adapté de la référence [196].

Enfin, une dernière méthode consiste à former des dipyrrométhènes à partir des dipyrrométhanes préalablement synthétisés<sup>[173, 197]</sup>. Les dipyrrométhènes sont formés par l'oxydation du dipyrrométhane en milieu acide. La présence de la charge électronique modifie considérablement les propriétés de stabilité et de réactivité des dipyrrométhènes par rapport aux dipyrrométhanes (Figure 64). Cette réaction de couplage nécessite de fondre une des quatre paires d'intermédiaire dipyrrométhène dans l'acide succinique ( $T_{fus} = 184^\circ C$ ) pendant plusieurs heures à l'air libre. Cette réaction permet de préparer uniquement des porphyrines totalement symétriques. De plus, les rendements de synthèse sont généralement faibles du fait des conditions sévères de réaction qui dégradent les substituants en position  $\beta$ . D'autres études ont montré que cette réaction à reflux dans l'acide méthanoïque anhydre avec un équivalent de brome permet d'obtenir des rendements de synthèse allant de 20 à 40%<sup>[173]</sup> (Figure 65).

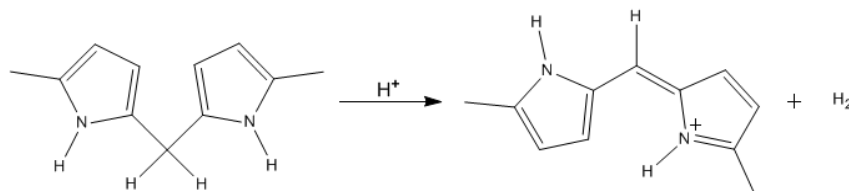


Figure 64 : Formation d'un dipyrrométhène à partir d'un dipyrrométhane, d'après la référence [173].

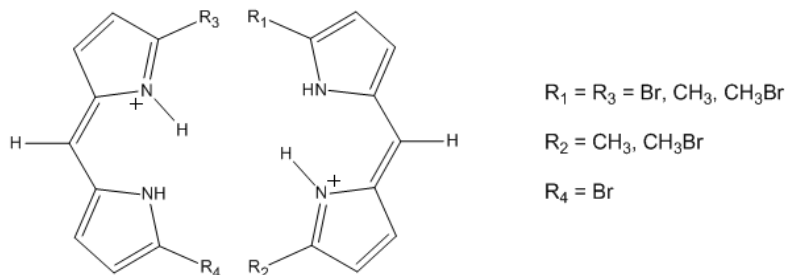


Figure 65 : Structures chimiques des dipyrométhènes couramment utilisés pour la synthèse de macrocycles, adapté de la référence [173].

Ces molécules peuvent également être obtenues à l'aide d'un agent oxydant <sup>[197]</sup> (Figure 66).



Figure 66 : Synthèse d'un dipyrométhène par l'oxydation du dipyrométhane correspondant, d'après la référence [197].

### • Synthèse « 3+1 »

La troisième méthode nommée synthèse « 3+1 » consiste à faire réagir un tripyranne dont les carbones en positions 1 et 14 sont non substitués avec un pyrrole portant deux fonctions alcool (par exemple (1H-pyrrole-2,5-diyl)diméthanol ou 2,5-bis-hydroxyméthylpyrrole) (Figure 67). Elle permet de synthétiser des porphyrines  $\beta$ -substituées mono-fonctionnalisées ou di-fonctionnalisées sur le même pyrrole avec des rendements voisins de 35% <sup>[34, 167, 177, 198]</sup>.

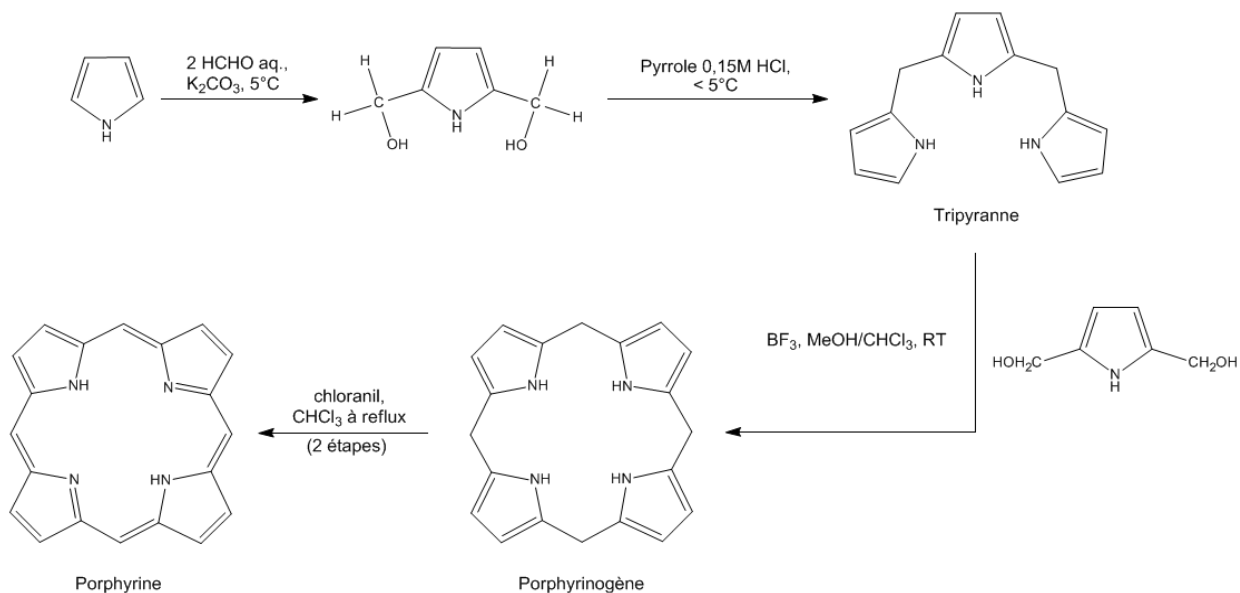


Figure 67 : Schéma de la synthèse d'une porphyrine par la méthode "3+1", d'après la référence [167].

- Méthode des bilanes

Le mécanisme de synthèse de cette réaction fait intervenir un intermédiaire porphyrinogène qui est obtenu par la condensation, catalysée par un acide, de plusieurs motifs pyrroliques avec un aldéhyde pour former, *in situ*, un tétrapyrrole linéaire (ou bilane) (Figure 68). Cette chaîne est ensuite cyclisée, le plus souvent, avec un catalyseur métallique (comme le  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ) à reflux dans un solvant organique (typiquement le  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Le produit est ensuite traité avec un acide fort (tel que  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) pour éliminer l'ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ) chélaté dans le macrocycle <sup>[173]</sup>. Cette méthode de synthèse donne des rendements de 20 à 30% <sup>[173]</sup>.

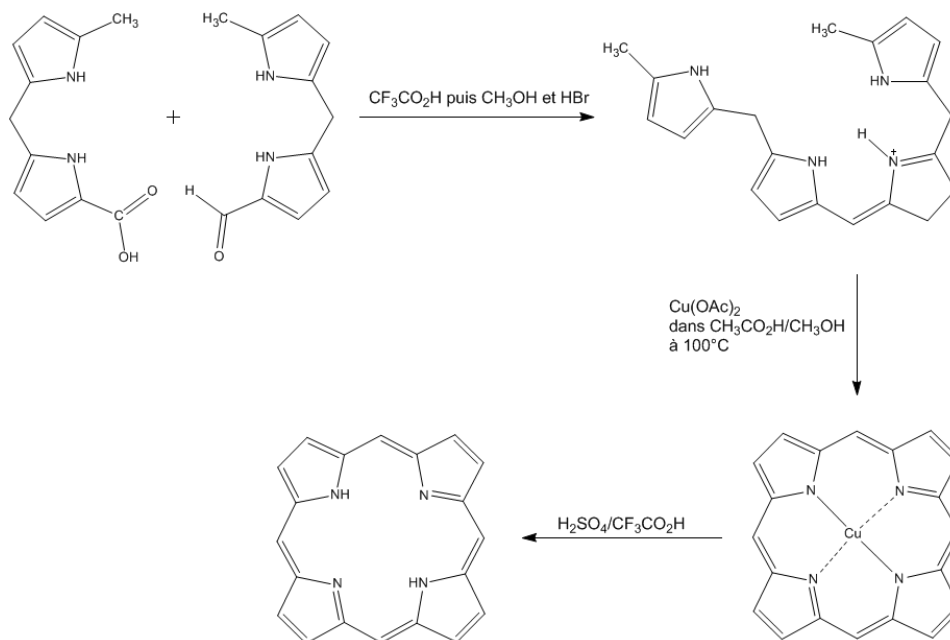


Figure 68 : Schéma de la réaction de synthèse d'une porphyrine à partir de bilanes, adapté de la référence [173].

- Synthèse micro-onde

Le procédé de synthèse assisté par microondes est une méthode qui a prouvé sa validité pour la synthèse de différents types de composés (Figure 69, Figure 70). L'étape d'irradiation à remplacer celle du chauffage utilisé dans la méthode classique de Rothemund. Cette technique montre des avantages significatifs d'un point de vue écologique ainsi que de rapidité et de sélectivité des produits obtenus. Suite à la première synthèse réussie de la *méso*-5,10,15,20 tétraphénylporphyrine, une large gamme de composés a été obtenue dont les métalloporphyrines <sup>[175, 199]</sup>.

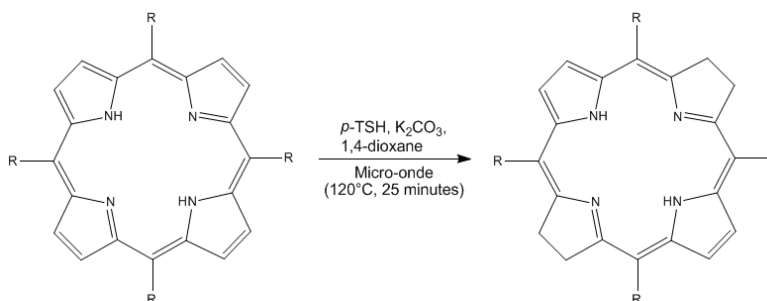


Figure 69 : Réaction de l'étape de synthèse d'une bactériochlorine, d'après la référence [199].

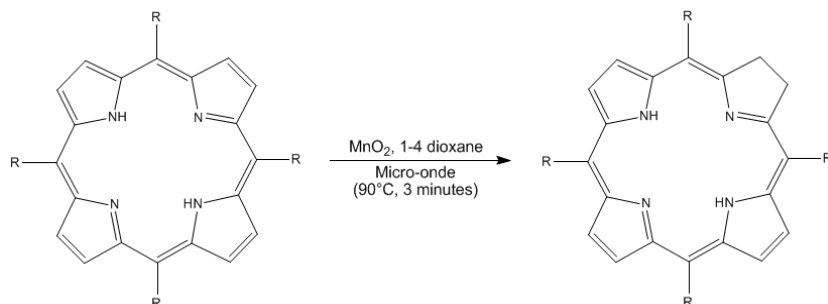


Figure 70 : Réaction de l'étape de synthèse d'une chlorine d'après la référence [199].

### I. 4. c. Les photosensibilisateurs de deuxième génération utilisés en clinique ou en recherche clinique

Peu de photosensibilisateurs sont utilisés en traitement clinique. Les principales molécules sont citées ci-après.

- Le Foscan® ou Temoporfin, un composé de *m*-THPC (Figure 71), a reçu une AMM européenne en 2001 est actuellement utilisé dans le traitement palliatif des carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou, le cancer de la prostate ainsi que les mélanomes avancés, le traitement des lésions de l'œsophage et des bronches liées à cette maladie, après l'échec des traitements antérieurs et chez les patients qui ne peuvent pas être traités par radiothérapie, chirurgie ou chimiothérapie systémique (Figure 72) [200, 201].

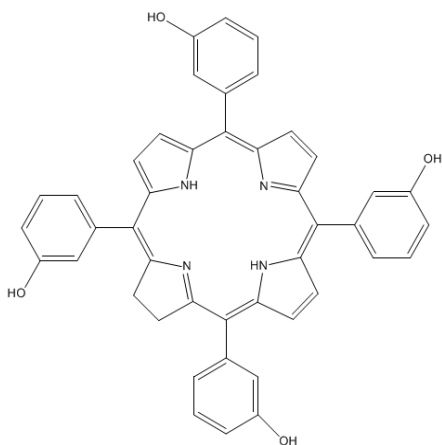


Figure 71 : Structure chimique de la *m*-THPC.

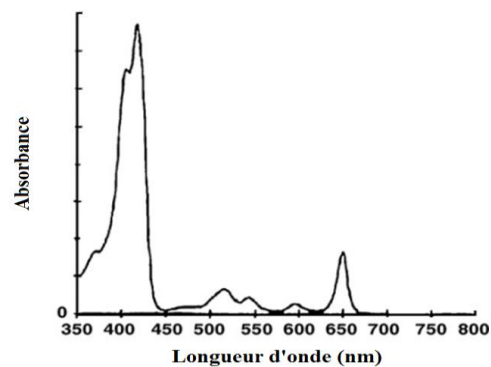


Figure 72 : Spectre d'absorption UV-visible de la *m*-THPC dans la DMF.

- Le Gliolan® ou Levulan® (5 ALA ou Acide 5-aminolévulinique) (Figure 73) est utilisé dans le traitement du gliome malin, des tumeurs de l'œsophage par prise des molécules par voie orale et les dysplasies de l'épithélium qui a reçu son AMM en France en 2000 et en Allemagne en 2007 [200]. Cet acide aminé naturel est en fait un précurseur de la PpIX (Figure 74) qui est obtenue suite à la conversion de l'ALA par réaction enzymatique qui elle-même entre dans le cycle de formation de l'hème [202] (Figure 76). L'administration par voie générale de ce pro-médicament ne présente pas de capacité de sélectivité mais, son administration locale permet d'obtenir un traitement sélectif sans qu'il y ait de photosensibilité à la lumière des zones non traitées. Cependant, la PpIX est une molécule dont le coefficient d'absorption molaire dans le rouge est faible (Figure 75) de plus, malgré l'utilisation d'anesthésiques locaux, la PDT à partir du ALA peut être une opération douloureuse [203].

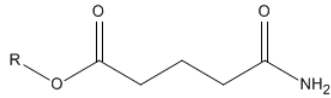


Figure 73 : Structure chimique de l'ALA et de ses dérivés (R = H : ALA, R = CH<sub>3</sub> : méthyl-ALA, R = C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> : héxyl-ALA).

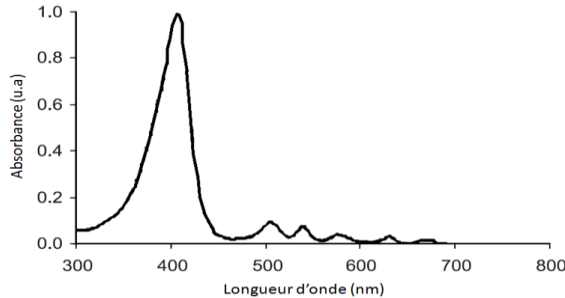


Figure 75 : Spectre d'absorption UV-visible de la PpIX dans le DMSO, adapté de la référence [204].

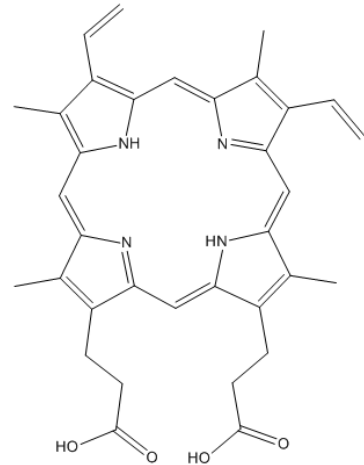


Figure 74 : Structure chimique de la PpIX.

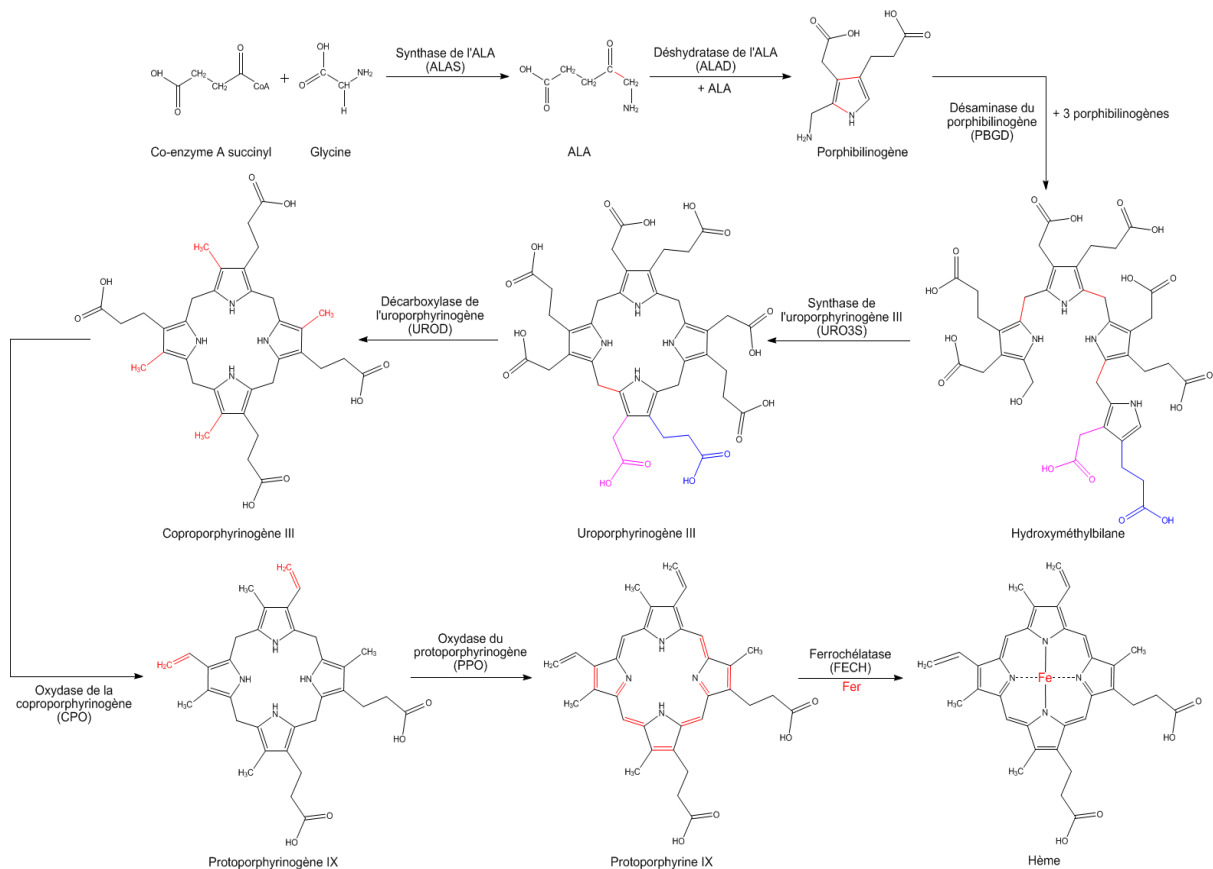


Figure 76 : Schéma de synthèse biologique de la protoporphyrine IX, adapté de la référence [202].

La forme méthylée de l'ALA (Me-ALA), qui se présente sous forme d'une crème à appliquer localement, connue sous le nom commercial de Metvix® en Europe et de Metvixia® aux USA, a été approuvée par la FDA pour le traitement à l'aide d'une source de lumière rouge des carcinomes baso-cellulaires superficiels, des kératoses actiniques planes ou hyperkératosiques du visage et du cuir chevelu. Ce médicament a également été approuvé et a reçu son approbation par une AMM Européenne en 2006 pour le traitement des carcinomes des cellules basales superficielles<sup>[200]</sup>. Notons que les deux formes de

l'ALA présentées ci-dessus ont également prouvé leur efficacité clinique dans le traitement photo-induit de l'acné vulgaire inflammatoire.

- La Verteporfin (Figure 77) est une molécule qui a reçu son AMM européenne en 2000 et qui est commercialisée, encapsulée dans des liposomes, sous le nom de Visudyne<sup>[200]</sup>. C'est un dérivé de la benzoporphyrine qui possède un  $\epsilon$  élevé à 680 nm (Figure 78) et qui se présente sous forme d'une poudre cliniquement active lorsqu'elle est administrée en solution par perfusion mais qui peut également être utilisée encapsulée dans des liposomes. La majorité des réponses cliniques induites par la Verteporfin est basée sur la destruction vasculaire. De plus, cette molécule est rapidement accumulée et éliminée par l'organisme ce qui minimise la photosensibilité de la peau. Elle a ainsi été utilisée avec succès pour le traitement de la *néovascularisation choroïdale liée à la chorioretinopathie séreuse*, la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age)<sup>[205]</sup>.

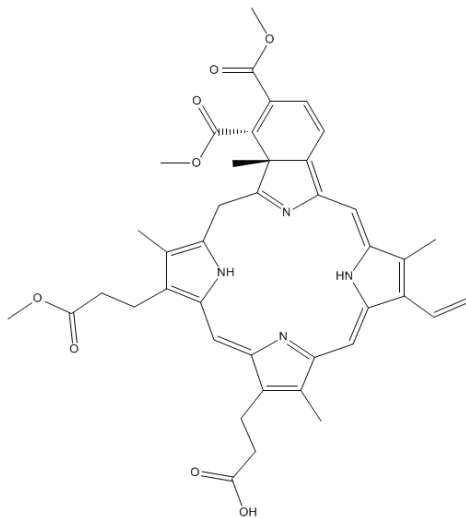


Figure 77 : Structure chimique de la Verteporfin.

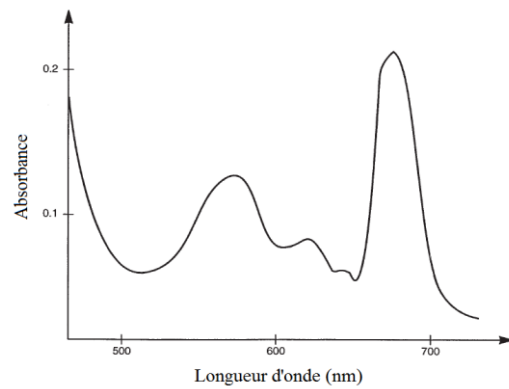


Figure 78 : Spectre d'absorption UV-visible de la Verteporfin dans l'eau, adapté de la référence [205].

Il existe d'autres molécules en cours de développement clinique et qui sont répertoriées dans le Tableau 4.

Tableau 4: Photosensibilisateurs approuvés au niveau clinique, tiré de la référence [156].

Nom commercial	Photosensibilisateur	Structure	Longueur d'onde maximale d'excitation (nm)	Niveau d'approbation	Essais cliniques		Cancers concernés
					Pays	Stade	
Photofrin®, HpD	Porfimère disodique	Porphyrine	630	Mondial	-	Utilisation clinique	Poumon, oesophage, canal biliaire, vessie, cerveau, ovaire
Levulan®	ALA	Précurseur de porphyrine	635	Mondial	-	Utilisation clinique	Peau, vessie, cerveau, oesophage
-	Esters d'ALA	Précurseur de porphyrine	635	Européen	-	Utilisation clinique	Peau, vessie
Foscan®	Témoporfine (m-	Chlorine	652	Européen	Etats Unis	III	Tête et cou,



	THPC)						poumon, cerveau, peau, canal biliaire
Visudyne®	Verteoporfin (encapsulée dans des liposomes)	Chlorine	690	Mondial (Dégénérescenc e maculaire liée à l'âge)	Grande Bretagne	-	Ophthalmolo gie, pancréas, peau
-	HPPH	Chlorine	665	-	Etats Unis	-	Tête et cou, oesophage, poumon
Purlytin	SnEt <sub>2</sub>	Chlorine	660	-	Etats Unis	-	Peau, sein
LS11, MACE, NPe6	Talaporfine	Chlorine	660	-	Etats Unis	-	Foie, colon, cerveau
Fotolon	Ce6-PVP	Chlorine	660	-	Biélorussie, Russie	-	Rhinophary nx, sarcome, cerveau
Radachlorin , Photoditha zine	dérivés de Ce6						
Pc4	Phtalocyanine silicée	Phtalocyanine	675	-	Etats Unis	-	Lymphome cutané à cellules T
TOOKAD	Padoporfine	Bactériochlori nes	762	-	Etats Unis	-	Prostate
Lutex	Motéxafine lutécium	Téxaphyrine	732	-	Etats Unis	-	Sein

Les PS de 2<sup>ème</sup> génération montrent une affinité pour la tumeur relativement meilleure par rapport aux tissus sains du fait de plusieurs paramètres que sont un fort métabolisme des cellules cancéreuses, un drainage lymphatique insuffisant, une différence de pH entre tissus sains et tissus tumoraux. Afin de favoriser la sélectivité des PS pour les tissus cancéreux, une nouvelle classe de molécules a vu le jour, qui consiste en des PS vectorisés ou adressés. Ces molécules représentent les PS de troisième génération.

#### **I. 4. d. Photosensibilisateurs de troisième génération**

Les PS de troisième génération diffèrent de la seconde génération par l'utilisation d'une molécule vectrice ou d'un module d'adressage permettant de délivrer le PS de manière localisée. Cette vectorisation peut s'effectuer par l'intermédiaire de modules d'adressage de natures multiples. On distingue, dans le ciblage actif, deux catégories qui ont été mentionnées précédemment : le ciblage actif direct (qui vise les cellules constitutives de la tumeur) et le ciblage actif indirect (qui vise les néo-vaisseaux tumoraux). La faible solubilité de la majorité des photosensibilisateurs en solutions aqueuse, et plus particulièrement au pH physiologique, empêche leur injection directe dans le système circulatoire sanguin. Pour augmenter le ciblage et la phototoxicité par la concentration des PS dans les tissus tumoraux, des systèmes permettant le transport des PS jusqu'aux tissus à traiter ont été développées.

#### **I. 4. e. Intérêt de l'adressage/vectorisation**

Les stratégies de ciblage peuvent être séparées en deux grandes familles :

## • Le ciblage actif

Du fait de la surexpression des biomarqueurs dans certaines maladies comme le cancer, les PS peuvent être accumulés sélectivement dans la zone ciblée plutôt que dans les autres tissus grâce à l'utilisation des molécules d'adressage <sup>[206]</sup>. Ceci est obtenu par la conjugaison de molécules pour la reconnaissance biologique aux nanoparticules. Ces molécules doivent posséder une grande affinité par rapport à des molécules uniques de signature (antigènes ou récepteurs) se trouvant à la surface des cellules à cibler. Les ligands dont le potentiel est utilisé pour le ciblage des récepteurs cellulaires incluent l'acide folique, les peptides, les anticorps et l'acide hyaluronique par exemple <sup>[207]</sup>.

### - Ciblage actif direct (ciblage de la cellule cancéreuse)

Il repose sur une internalisation du photosensibilisateur au niveau des cellules tumorales. La surexpression de récepteurs à la surface des cellules tumorales permet d'obtenir une bonne affinité du PS par reconnaissance de la molécule d'adressage qui lui est liée. Ainsi, il existe différentes molécules utilisées à cet effet comme par exemple certains sucres <sup>[208, 209]</sup> et l'acide folique reconnu <sup>[210, 211]</sup> par des récepteurs surexprimés par certaines lignées tumorales (ovaire, utérus) <sup>[212]</sup> ou encore des peptides.

#### *Les récepteurs à œstrogène*

Les récepteurs à œstrogène (ER : *nuclear receptor for œstrogen*) représentent une cible potentielle pour la PDT puisque ceux-ci sont surexprimés dans les cancers du cerveau, des ovaires et du sein <sup>[213, 214]</sup>. Swamy et al. ont montré qu'une porphyrine, la P<sub>1</sub>-COOH, couplée à un motif œstradiol (un dérivé C(11)-bêta de l'œstradiol) par l'intermédiaire d'un bras espaceur (Figure 79) présente une meilleure internalisation dans des cellules surexprimant les récepteurs à œstrogène MCF-7 par rapport aux cellules ne les exprimant pas (ex : MDA-MB-231). Cette augmentation d'internalisation n'a pas pour autant induit une activité photodynamique efficace du PS <sup>[215]</sup>. Une autre étude plus récente de ciblage des récepteurs nucléaires à l'œstradiol fait intervenir le phéophorbide a couplé à un motif œstrogénique <sup>[216]</sup>. El Akra et al. ont notamment prouvé, par microscopie confocale sur la lignée cellulaire MCF-7, que le phéophorbide a conjugué à l'œstradiol se localise préférentiellement dans le noyau cellulaire. De plus, ils ont constaté que celui-ci possède une efficacité photodynamique 7 fois supérieure à celle observée pour le PS seul <sup>[211, 216]</sup>.

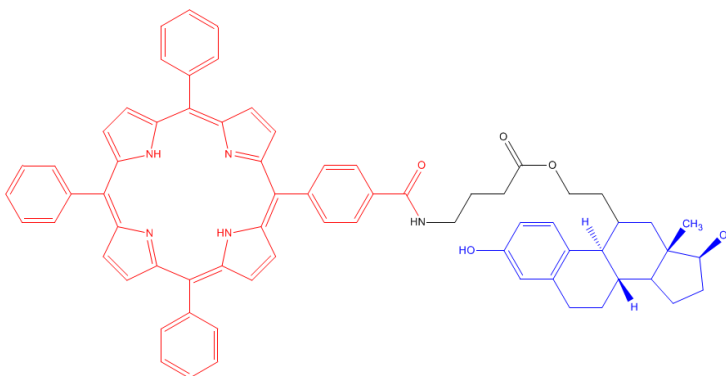


Figure 79 : Structure chimique d'un composé porphyrine-œstradiol, d'après la référence [215].

#### *Le récepteur de l'acide folique*

Le récepteur à l'acide folique ou FBP (*Folate Binding Protein*) est un récepteur surexprimé dans plusieurs types de cancers notamment ceux de l'ovaire, du rein, des cellules myéloïdes, du poumon et du cerveau

et localisé sur la membrane apicale des cellules de l'épithélium. Il est connu que ce récepteur possède une forte affinité pour son ligand et que sa densité augmente avec l'avancement du stade cancéreux <sup>[210]</sup>. L'étude de ce récepteur a apporté des résultats très intéressants, qui ont notamment fait l'objet de plusieurs publications lors de la thèse de Julien Gravier (2004-2008) <sup>[211]</sup>. Une chlorine (TPC-COOH) couplée à l'acide folique (vitamine B9 hydrosoluble) *via* deux bras espaceurs (1,6 diaminohexane et 2,2'-(éthylènedioxy-di-(éthylamine)), a été développée et l'étude biologique de ces molécules a été réalisée sur des cellules KB surexprimant les récepteurs à l'acide folique <sup>[210]</sup> (Figure 80). Le PS pouvant être fixé à l'acide folique soit par le groupement carboxylique  $\alpha$ , soit par le groupement  $\gamma$  de ce dernier, il a été prouvé que la liaison par la position  $\gamma$  offre une plus forte affinité pour les FBP que son homologue greffé sur la position  $\alpha$ . L'incubation de cellules KB au contact des deux assemblages « PS-bras espaceur-acide folique » a montré que le PS couplé était sept fois plus internalisé que le PS seul, après 24 h. Deux assemblages ont également montré un meilleur effet PDT comparé au PS seul, avec un effet photocytotoxique de l'assemblage contenant le bras espaceur 2,2'-(éthylènedioxy-di-(éthylamine)) 3,4 fois supérieur à celui obtenu pour l'assemblage contenant le 1,6 diaminohexane <sup>[210]</sup>. Il a aussi été montré par un test de compétitivité entre l'acide folique seul, l'acide folique conjugué au PS et le PS seul que la présence du ligand diminue l'internalisation du PS conjugué mais que cela n'affecte pas l'entrée du PS seul dans les cellules prouvant ainsi que le mécanisme d'incorporation du conjugué s'effectue effectivement par l'intermédiaire du récepteur FBP <sup>[210, 211]</sup>. Il a également été démontré par spectrofluorimétrie, par fibre optique chez la souris xénogreffée, que l'accumulation du PS adressé dans les tumeurs exprimant les récepteurs à l'acide folique, 4 h après injection, était deux fois supérieure à celle de la chlorine seule et que la sélectivité est améliorée d'un facteur 5 pour le tissu tumoral par rapport au tissu sain. Cette étude a notamment été poursuivie en étudiant la vectorisation de quantum dots par l'acide folique pour une application en PDT avec les travaux de thèse de Vincent Morosini (2006-2010) <sup>[217]</sup>.

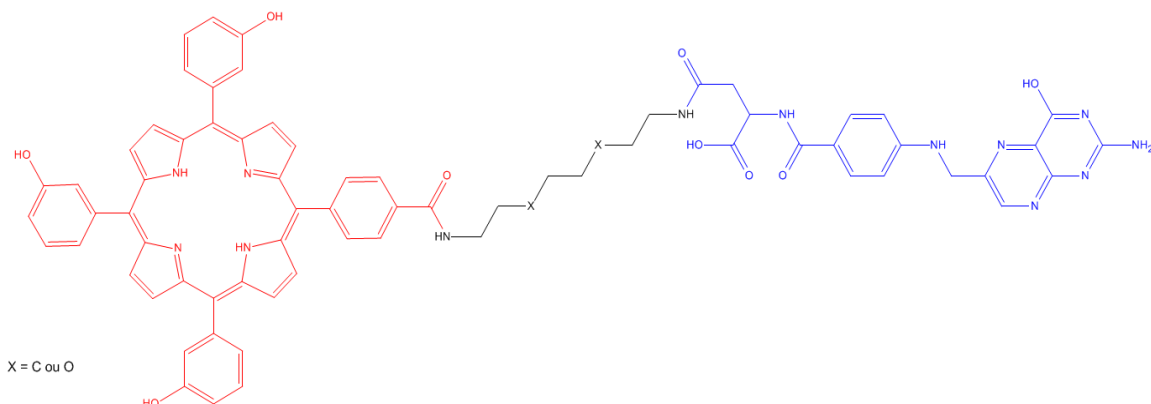


Figure 80 : Structure chimique des conjugués «*m*-THPC-*like*» - acide folique synthétisés par Julien Gravier.

### Les lectines

Il a été prouvé que certaines cellules cancéreuses surexpriment des récepteurs aux sucres à leur surface, les lectines, qui sont des glycoprotéines. Une autre voie de ciblage actif consiste à utiliser des photosensibilisateurs glycoconjugués obtenus par couplage d'un photosensibilisateur avec un sucre. Notre équipe de recherche a publié des études sur ce type de ciblage, notamment lors de la thèse de Benoît Di Stasio (2003-2007) <sup>[218]</sup> qui a montré une incorporation préférentielle d'une molécule composée d'une porphyrine et de dérivés glucosamine dans les cellules HT29 surexprimant ces récepteurs par rapport à la porphyrine seule <sup>[208, 209]</sup> (Figure 81).

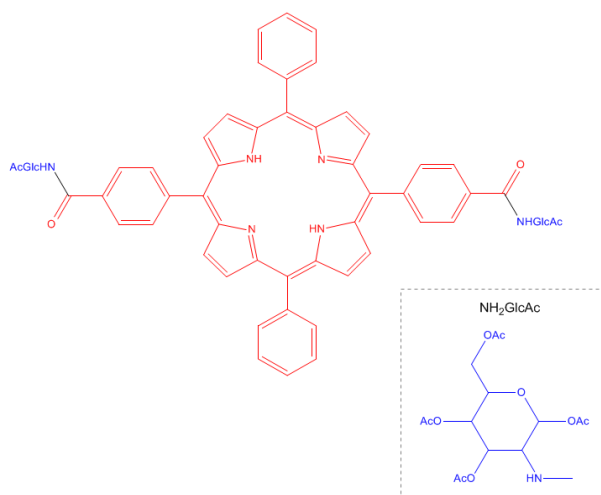


Figure 81 : Structure chimique d'une porphyrine couplée à des sucres, adapté de la référence [209].

D'autres équipes travaillent à l'amélioration de cette voie de ciblage en utilisant différents types de sucres (mannose, galactose) <sup>[219-224]</sup>. Des tétraphénylporphyrines (mono- et di-glucosylée), ainsi qu'une tétraphénylchlorine mono-glycosylée ont été testées sur des cellules HT29 (carcinome humain). Ces PS ont montré une activité photodynamique sensiblement supérieure à celle de la tétraphénylporphyrine seule. Maillard et al. ont synthétisés des porphyrines portant des sucres acétylés (acétyl- $\beta$ -D-glucose, acétylmaltose) <sup>[225, 226]</sup> déprotégés avant leur utilisation (Figure 82). Les PS ainsi obtenus présentent les avantages d'être hydrophiles, non-ionisables et non agrégés du fait de l'encombrement stérique dû aux sucres <sup>[225, 227]</sup>. Le  $\alpha$ -D-mannopyranose a été couplés avec succès à des nanoparticules mésoporeuses, dans l'équipe de Jean-Olivier Durand <sup>[228-230]</sup>.

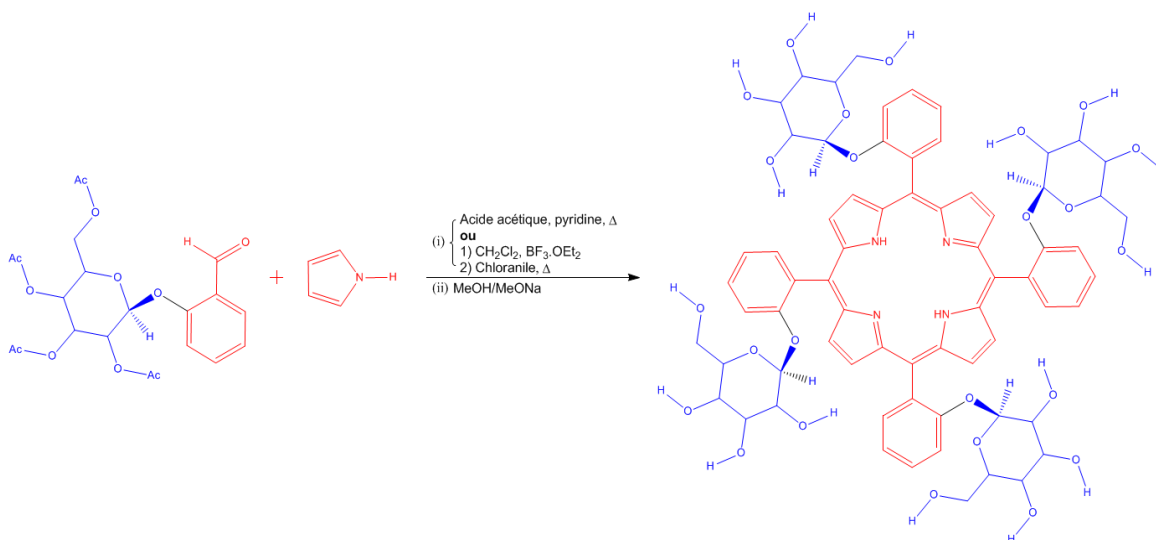


Figure 82 : Schéma de synthèse d'une tétraphénylporphyrine glycosylée, adapté de la référence [225].

Cette méthode de synthèse a ensuite été généralisée à l'étude photophysique et biologique de plusieurs dérivés glycosylés de la *m*-THPC <sup>[231-233]</sup> et de la *m*-THPP <sup>[231]</sup>. Les études menées sur les dérivés tri-glycosylés ont montré qu'ils présentent une plus grande activité photodynamique que leurs composés parents et que les conjugués tétra-glycosylés possèdent la meilleure internalisation dans les cellules de carcinome humain HT29 <sup>[226, 231]</sup>. Cet effet est attribué en partie à un mécanisme d'endocytose médié par

des récepteurs avec une localisation préférentielle dans les mitochondries <sup>[231]</sup>. De plus, l'activité photodynamique est quatre fois supérieure à celle de la *m*-THPC seule.

### *L'utilisation des métabolites cellulaires*

Au lieu de cibler les récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses, il est également possible d'utiliser leur hyperactivité métabolique. En effet, les cellules cancéreuses se trouvant dans une phase de développement intense, en comparaison des cellules normales, ont un métabolisme accru qui, par l'intermédiaire du PAT (*polyamine transport system*), favorise l'accumulation des polyamines de type spermine, spermidine et putrécines nécessaires à leur croissance <sup>[234]</sup>. Des études relatant la synthèse et l'étude biologique de PS conjugués à des motifs polyamines sont développées notamment par l'équipe de Vincent Sol <sup>[235, 236]</sup>. Ils ont montré que la protoporphyrine IX (PpIX) couplée à deux motifs polyaminés (Figure 83) présentent une internalisation et une cytophotoxicité supérieures à celle du Photofrin® pour des cellules K562 de la leucémie miélogène humaine <sup>[236]</sup>. Il a également été montré que cette porphyrine couplée à la spermine et à la spermidine s'intercalent entre les brins d'ADN, de plasmides de type pBR322 (thymus de veau), qu'elle dénature par formation d'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> suite à son excitation. De plus, ces assemblages moléculaires possèdent une meilleure hydrophilie et une bonne internalisation dans les cellules cancéreuses de types HaCat et MCF7 par rapport au Photofrin® <sup>[237]</sup> mais il n'y a pas d'influence significative de la nature, du nombre et de la position des chaînes polyamines greffées sur le macrocycle <sup>[237]</sup>.

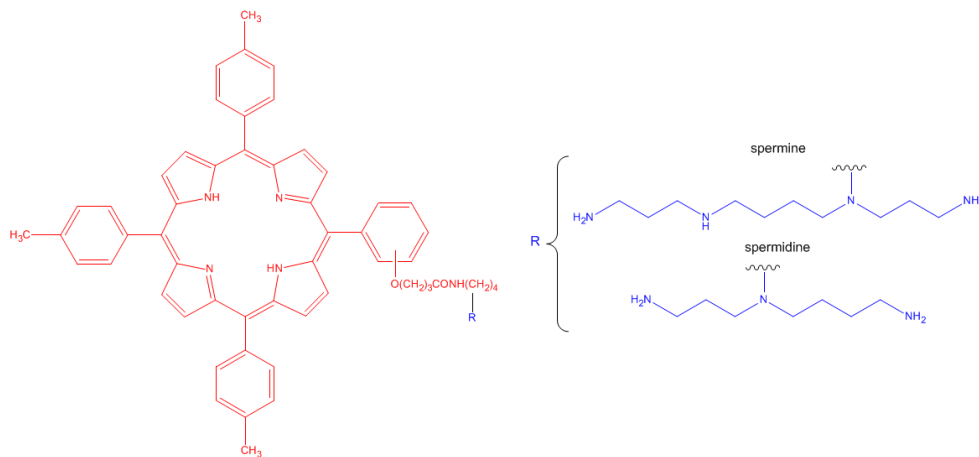


Figure 83 : Formule développée de deux conjugués porphyrine-polyamines, adapté de la référence [236].

### - **Ciblage actif indirect : ciblage de la néovascularisation**

Dans les années 70, Folkman, un chirurgien du *Children's Hospital* de Boston observa que toute tumeur d'une taille supérieure à 1-2 mm<sup>3</sup> développait son propre réseau vasculaire <sup>[238]</sup>. Ces néo-vaisseaux, se développant à partir du réseau capillaire pré-existant, vont constituer de nombreux canaux d'irrigation prenant naissance au niveau des vaisseaux normaux. On parle alors de phénomène d'angiogenèse. Ce mécanisme de vascularisation, indispensable lors de nombreux processus physiologiques, est particulièrement important lors du développement tumoral. Ainsi, une néo-angiogenèse importante est couramment observée en cas de cancer. L'angiogenèse se décompose en quatre étapes (Figure 84) : la première étape consiste en la sécrétion de facteurs préangiogéniques et en la dégradation de la membrane basale (I), elle est suivie de la migration des cellules endothéliales (II) puis la prolifération des cellules endothéliales (III). Après ces trois étapes, le remodelage vasculaire intervient pour former un nouveau vaisseau sanguin (IV).

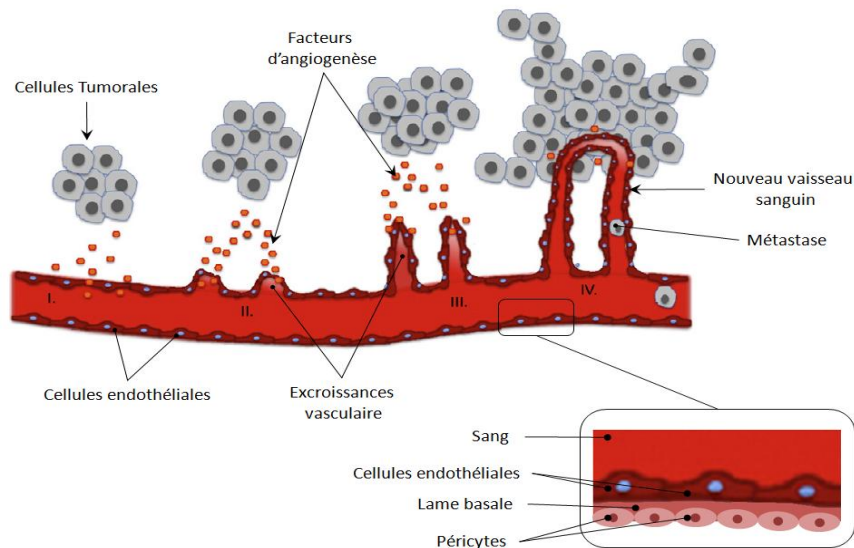


Figure 84 : Les différentes étapes de l'angiogénèse, adapté de la référence [239].

La multiplication non contrôlée des cellules tumorales induit une forte demande en oxygène et en nutriments pour permettre leur survie. Ceci conduit à la mise en place d'un mécanisme d'angiogénèse par l'intermédiaire de facteurs de croissance, sécrétés par les cellules cancéreuses (Figure 85), dont font parti les NRPs (NRP-1 et NRP-2) et les VEGFRs (VEGFR-1 et VEGFR-2) (récepteurs à tyrosine kinase du VEGF) <sup>[240]</sup>. Parallèlement, la croissance de la masse tumorale entraîne un stress mécanique qui se traduit par une augmentation de pression sur les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ce stress mécanique va donc réduire le flux sanguin et lymphatique au niveau de la partie interne de la tumeur. Ceci va alors entraîner une diminution de l'apport en nutriments et une réduction du taux d'oxygène utilisable par les cellules conduisant à un phénomène d'hypoxie qui va entraîner une glycolyse anaérobie. Pour les tumeurs de taille supérieure ou égale à un volume de 1 à 2 mm<sup>3</sup>, cette compression entraîne également une diminution de la capacité d'élimination des déchets produits par les cellules (CO<sub>2</sub>, acide lactique) créant un phénomène d'acidose qui s'ajoute à l'hypoxie intratumorale. L'acidose va entraîner un mécanisme d'angiolymphatogénèse qui va induire la formation de vaisseaux lymphatiques hyperplastiques et de métastases. L'hypoxie va, quant à elle, conduire à un mécanisme d'angiogénèse d'une néovascularisation sanguine anarchique sur le plan structural et sur le plan spatiale <sup>[241]</sup>. Cette absence d'ordre au niveau de la formation des vaisseaux sanguins entraîne une augmentation de la résistance du flux sanguin dans les vaisseaux ainsi qu'une augmentation de l'IFP (*Interstitial Fluid Pressure*) à l'intérieur de la masse tumorale mais pas à son pourtour <sup>[242]</sup>.

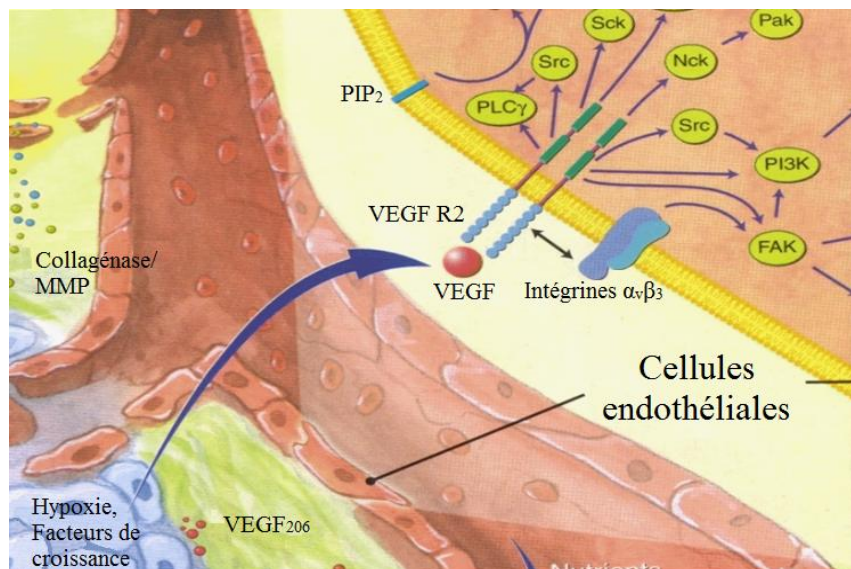


Figure 85 : Schéma synthétique des principaux effecteurs biologiques opérant au niveau de la cellule endothéliale lors de l'angiogenèse tumorale.

Une voie thérapeutique relativement nouvelle dans l'arsenal anti-cancéreux consiste à inhiber le processus d'angiogenèse (thérapie anti-angiogénique) ou à détruire les vaisseaux nouvellement formés par élimination des cellules endothéliales proliférantes de phénotype angiogénique (thérapie anti-néovasculaire), afin de bloquer l'apport en nutriments et en oxygène à la tumeur, dans le but de l'asphyxier et de la faire régresser. Dans le cadre d'un traitement par thérapie photodynamique, cette stratégie est nommée VTP pour *Vascular Targeted Photodynamic therapy*. La VTP apparaît comme une stratégie prometteuse dans le traitement du cancer par comparaison à des approches plus conventionnelles visant les cellules tumorales <sup>[243, 244]</sup>. Elle vise à détruire les cellules endothéliales incontrôlables qui expriment des marqueurs que les cellules endothéliales normales n'expriment pas ou faiblement (antigènes, récepteurs aux facteurs de croissance etc.) dont font partie les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , les récepteurs des tyrosines kinases, des éphrines et ceux du VEGF, auxquels nous nous intéressons ici.

La stratégie d'adressage des photosensibilisateurs <sup>[245]</sup> vis-à-vis des cellules endothéliales angiogéniques, initiée en 2005, s'inscrit donc dans ce nouveau mode de traitement.

### Les intégrines $\alpha_v\beta_3$

Les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  sont des protéines transmembranaires exprimées de façon exclusive à la surface des cellules endothéliales activées par le VEGF lors de l'angiogénèse. Ces protéines ont pour rôle de réguler l'angiogenèse en permettant une bonne interaction des cellules endothéliales activées, avec le milieu biologique, lors de leur migration. Ces protéines ont fait l'objet de travaux au LRGP, LCPM et CRAN du fait de leur affinité intéressante pour le peptide RGD sous forme cyclique ou non. Ces travaux ont consisté à coupler la tétraphénylchlorine et la tétraphénylporphyrine <sup>[246, 247]</sup>, par l'intermédiaire d'un bras Ahx, à l'un des deux motifs (cyclique/linéaire) de ce peptide <sup>[248]</sup> et ont montré une amélioration de l'activité PDT *in vitro* par augmentation de l'internalisation de cet assemblage moléculaire dans des cellules HUVEC <sup>[248]</sup>. Ainsi, le photosensibilisateur lié au motif RGD linéaire montre une incorporation 98 fois supérieure à celle du PS seul. Le PS lié au motif RGD cyclique est, quant à lui, incorporé 80 fois plus que le PS seul <sup>[248]</sup>. Ce peptide a également été couplé à deux PS glycolysés (O-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl) puis il a été testé sur des cellules K562 mais, il s'est révélé être moins efficace que le Photofrin® en terme de PDT <sup>[249]</sup>. Ce ciblage ne fera pas l'objet de cette thèse.



### Les récepteurs au VEGF (VEGFRs et NRPs)

Le VEGF est le précurseur indispensable à la libération de l'ensemble des facteurs de croissance (Figure 85). En se liant à ses récepteurs situés essentiellement au niveau des cellules endothéliales activées entourant les vaisseaux sanguins à proximité des tumeurs, le VEGF va déclencher des cascades de signalisations intracellulaires conduisant à la création d'un nouveau réseau vasculaire qui pourra assurer les fonctions d'approvisionnement et d'élimination nécessaire au développement de la tumeur <sup>[241]</sup>. Le DCPR puis le LRGP et ses collaborateurs (CRAN et LCPM) s'intéressent depuis une dizaine d'années au ciblage de la neuropiline-1 (NRP-1) qui est un des co-récepteurs du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) <sup>[250]</sup>. Les neuropilines sont des glycoprotéines transmembranaires de type « *single-pass* », originellement découverte dans le système nerveux du xénope. Cette famille de récepteurs est constituée de deux formes (NRP-1 et NRP-2) qui possèdent des structures tridimensionnelles homologues dont la similarité de leurs motifs est de 44%. La forme NRP-1 est localisée de façon primordiale au niveau des cellules endothéliales des artères alors que les NRP-2 sont localisées au niveau de l'endothélium veineux et lymphatique <sup>[251-253]</sup>. De ce fait, les NRPs sont donc exprimées dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales humaines dont font partie les carcinomes de la prostate, du rein, de la vessie, de l'estomac, du colon, du pancréas, du cerveau, des ovaires et des poumons. Elles sont également exprimées dans des glioblastomes, des neuroblastomes, des ostéosarcomes, des leucémies ainsi que certaines lignées cellulaires de mélanome <sup>[252, 254]</sup> (Tableau 5).

Tableau 5 : Taux de cancers présentant une surexpression du NRP-1 en fonction du type de cancer, d'après la référence [251].

Localisation du cancer	Taux de cancer montrant une surexpression du NRP-1
Vaisseaux sanguins du cancer du poumon et de sa forme métastatique	98%
Cancer colorectal	
Tumeurs cérébrales	
Carcinome primaire du cerveau	6%
Carcinome secondaire du cerveau	14%
Cancer primaire du poumon (NSCLCs)	36%
Cancer secondaire du poumon (NSCLC secondaire)	50%



Ces récepteurs possèdent une partie extracellulaire *N*-terminale qui est un ectodomaine composé de 5 motifs structuraux individuels : a1 et a2 (domaines homologues CUB), b1 et b2 (domaines homologues portant deux facteurs de coagulation V et VIII), c (domaine MAM) qui sépare le domaine b2 du domaine transmembranaire et qui permet l'interaction avec d'autres récepteurs <sup>[252, 254]</sup> (Figure 86). La partie intracellulaire des NRPs est, quant à elle, constituée d'un motif *C*-terminal capable d'interagir avec différentes protéines du cytoplasme <sup>[252]</sup>. Les ligands typiques de ces récepteurs sont les sémaphorines 3A <sup>[251]</sup> qui interagissent avec les domaines a1 et a2 pour le modelage de l'axone neuronal ainsi que l'isoforme VEGF<sub>165</sub> du VEGF-A qui se lie aux domaines b1 et b2 des NRPs au niveau des cellules endothéliales <sup>[252, 254, 255]</sup>. Plus particulièrement, la neuropiline-1 (NRP-1) est un récepteur de type I situé à la surface des cellules. Il intervient dans différents processus biologiques (la guidance de l'axone neuronal, l'angiogenèse, l'adhésion hétérophile des cellules). La neuropiline-1 est une protéine constituée d'une architecture de 130 kDa comprenant un domaine extracellulaire d'environ 850 acides aminés avec un module de grande taille possédant une fonction *N*-terminale. Cette partie est suivie d'un petit domaine transmembranaire hélicoïdal constitué d'environ 24 acides aminés puis d'un domaine cytoplasmique d'environ 40 unités <sup>[251, 255]</sup>.

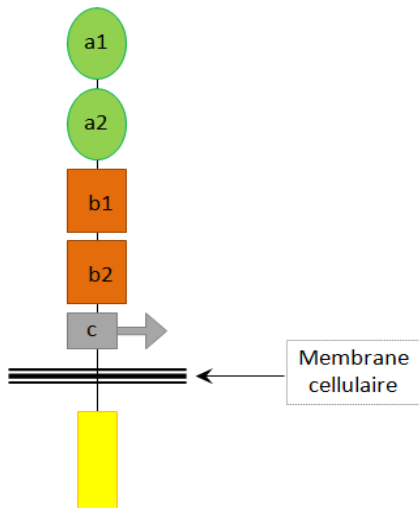


Figure 86 : Schéma du récepteur NRP-1, adapté de la référence [255].

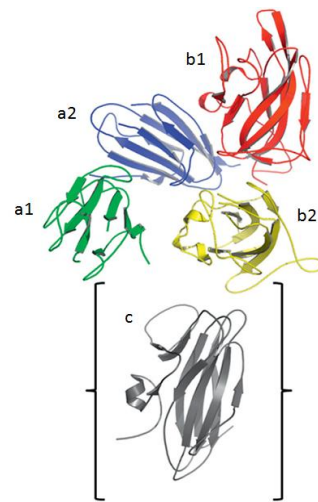


Figure 87 : Diagramme en ruban de la NRP-1 montrant la topologie et l'organisation de son ectodomaine, adapté de la référence [251].

Klagsbrun et al. sont les premiers à avoir proposé que les NRPs remplissent le rôle de récepteur aux VEGF, permettant de réguler le développement vasculaire <sup>[254]</sup>. Les NRPs remplissent le rôle de corécepteur du VEGF<sub>165</sub> en favorisant la liaison entre le VEGF<sub>165</sub> et le VEGFR-2, ce qui augmente l'activité mitogénique et angiogénique obtenue par l'intermédiaire du VEGFR <sup>[252, 256]</sup>. Les NRP-1 jouent des rôles similaires dans la guidance de l'axone et l'angiogénèse en fonctionnant comme un complexe de coréception par liaison de ligand approprié. Il existe également des formes solubles cytoplasmiques des NRP (sNRP) qui jouent le rôle d'antagoniste au VEGF <sup>[254]</sup>. Klagsbrun et al. ont montré que les tumeurs exprimant un fort taux de NRP-1 sont caractérisées par une forte densité de vascularisation ce qui les a conduits à proposer l'idée selon laquelle le NRP-1 a pour effet de réhausser l'effet du signal du VEGF sur les cellules endothéliales <sup>[254]</sup>. De plus, il a été montré sur des modèles *in vivo* du carcinome de la prostate que la surexpression du NRP-1 augmente la densité de microvascularisation tumorale et réduit ainsi la mort cellulaire par apoptose <sup>[252]</sup>. Une hypothèse de Folkman selon laquelle l'inhibition de l'angiogénèse dans les tumeurs solides peut être utilisée pour traiter les cancers <sup>[251]</sup> a été reprise par Kuo et al. qui ont montré qu'un pseudo-peptide peut bloquer l'effet du VEGF en se liant à NRP-1, ce qui conduit à l'inhibition de l'angiogénèse et à la réduction de la croissance tumorale <sup>[254]</sup>. De plus, il a été montré qu'il y a un effet additif de la réduction de la croissance tumorale et de la densité de vascularisation lors de l'utilisation de ligands anti-NRP-1 et anti-VEGF, ce qui a permis de conclure que le récepteur au NRP-1 est un corécepteur au VEGFR qui lui est lié <sup>[251, 254]</sup>. NRP-1 intervient également, par l'intermédiaire des intégrines, dans le mécanisme d'adhésion des cellules endothéliales à la matrice organique <sup>[251]</sup>. Différentes stratégies regroupant l'utilisation de siRNA (*small interfering RNA* ou *short interfering RNA* ou encore *silencing RNA*) pour le blocage de l'expression des NRPs, l'utilisation de petits peptides ligands inhibiteurs et l'utilisation d'anticorps de blocage des NRPs ont donc été développées afin de contrôler la néovascularisation <sup>[254]</sup>. Il est donc possible d'utiliser des peptides de synthèse pour le ciblage des cellules constitutives des néovaisseaux de vascularisation tumorale. La liaison entre l'isoforme VEGF<sub>165</sub> du VEGF-A <sup>[251]</sup> (par l'intermédiaire de sa région C-terminale) et le domaine b1 des NRP-1 a été mise en évidence par l'utilisation du Tuftsin® (Thr-Lys-Pro-Arg) qui est une séquence d'acides aminés similaires à la partie C-terminale du VEGF (Lys-Pro-Arg-Arg) <sup>[251]</sup>. Giordano et al. ont synthétisé un tripeptide (D-(Leu-Pro-Arg)) qui a montré une résistance à la protéolyse ainsi qu'une activité antiangiogénique par l'intermédiaire de NRP-1 et du VEGFR1 sur trois modèles *in vivo* de cancers <sup>[251]</sup>. Un oligonucléotide synthétique (G18) a également montré qu'il pouvait se lier à NRP-1 et permettre l'internalisation de la neuropiline ciblée, avec pour effet d'inhiber l'angiogénèse <sup>[251]</sup>. Le peptide ATWLPPR <sup>[257-259]</sup> (H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH) (Figure 88), dont nous parlons dans cette thèse montre une bonne spécificité pour le récepteur NRP-1. Une stratégie similaire a également été utilisée par Walker et al. qui ont couplé le peptide G-G-V-K-R-K-K-P-G-Y-G à la purpurine-18 <sup>[107]</sup>.

Deux thèses (Loraine Tirand, 2003-2007 et Noémie Thomas, 2004-2008) <sup>[250, 253]</sup> ont été consacrées à l'étude du ciblage de NRP-1 par ATWLPPR (Figure 88) conjugué à la chlorure TPC-COOH couplée à un bras espaceur : l'acide aminohexanoïque (Ahx) <sup>[245]</sup> (Figure 89).

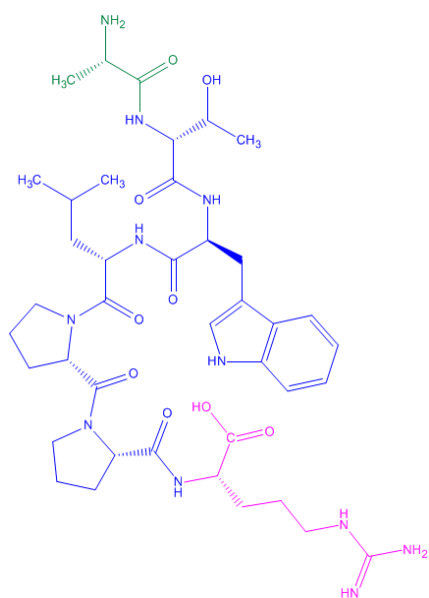


Figure 88 : Structure chimique du peptide ATWLPPR déprotégé, d'après la référence [245].

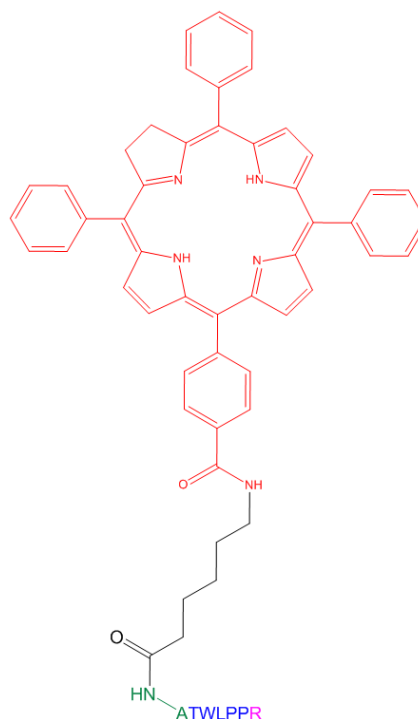


Figure 89 : Structure chimique de la molécule TPC-AHX-ATWLPPR, adapté de la référence [245].

### • Ciblage passif

Le ciblage passif consiste à encapsuler une substance dans une nanoparticule vectrice est de favoriser l'adressage des principes actifs vers les cellules cibles en augmentant les concentrations actives à leur niveau et en réduisant la toxicité liée à la dispersion des traitements dans l'organisme. Cette internalisation permet de protéger le site d'administration, de protéger la molécule active et d'améliorer le passage des barrières tissulaires notamment par l'intermédiaire de l'effet EPR (Figure 90). Cet effet qui est dû à une vascularisation défectueuse et à un déficit de drainage par le système lymphatique au niveau des tumeurs solides, conduit à une augmentation de la taille des pores de la paroi endothéliale donnant ainsi lieu à une plus forte rétention et une accumulation accrue des molécules à l'intérieur des cellules tumorales par rapport aux cellules saines. Cet effet entraîne une pénétration sélective des macromolécules et des nanoparticules au niveau de ces tissus <sup>[260]</sup> (Figure 90). Lorsque les molécules et/ou les nanoparticules sont plus grosses que le seuil de coupure du tissu endothélial, il se produit une faible internalisation des molécules dans les cellules tumorales. Lorsque, au contraire, les nanoparticules sont plus petites que le seuil de coupure endothélial, celles-ci peuvent à la fois entrer et sortir facilement du tissu tumoral, ce qui se traduit par leur faible accumulation au niveau de la tumeur. Ce n'est que lorsque les nanoparticules ont une taille optimale que l'effet EPR est maximum et qu'il en résulte une augmentation de leur accumulation au niveau tumoral <sup>[207]</sup>. Ainsi, il a été rapporté que les grosses nanoparticules (150-300 nm) ont tendance à s'accumuler dans le foie et la rate ; les nanoparticules de taille moyenne (30-150 nm) se retrouvent quant à elles dans la moelle osseuse, le coeur, les reins et l'estomac alors que les plus petites (inférieures à 10 nm) sont excrétées par voie rénale. Il a également été montré que la charge de surface et l'hydrophobie des nanoparticules peuvent influencer le ciblage passif par les nanoparticules <sup>[207]</sup> : chargées négativement et possédant une surface hydrophile, elles ont tendance à avoir un long temps de circulation *in vivo* <sup>[207]</sup>. De plus, les nanoparticules avec une surface

hydrophile peuvent éviter la reconnaissance par le SRE et ainsi prolonger leur temps de circulation dans le corps augmentant ainsi leur probabilité d'accumulation dans le site tumoral <sup>[207]</sup>. A l'opposé, les nanoparticules hydrophobes et chargées positivement ont, de manière générale, un faible temps de circulation du fait de leur adsorption sur les protéines contenues dans le plasma sanguin (ou opsonisation) et de leur agrégation dans le sang qui peut conduire à leur détection par le système réticuloendothélial provoquant alors leur élimination rapide du système circulatoire <sup>[207]</sup>.

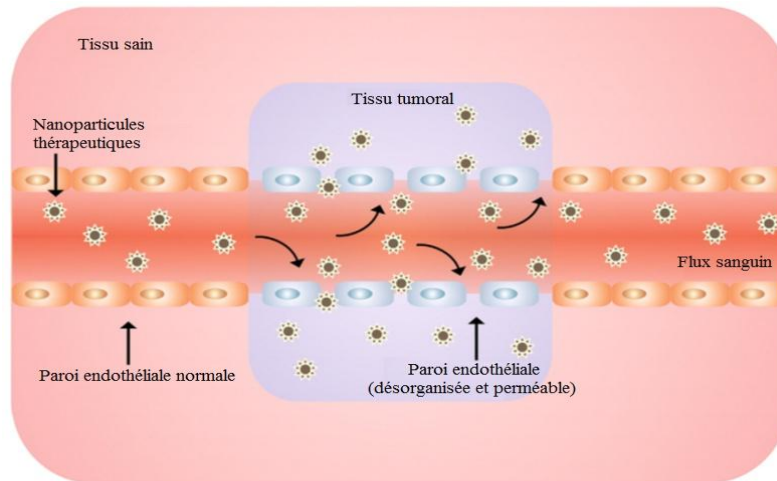


Figure 90 : Représentation schématique du ciblage tumoral avec des nanoparticules par l'intermédiaire de l'effet EPR, adapté de la référence [261].

## I. 5. Les nanoparticules

Bien que la plupart des photosensibilisateurs possèdent d'excellentes performances en PDT (phtalocyanines, porphyrines et chlorines), leur utilisation reste limitée du fait de leur faible sélectivité pour les tissus tumoraux induisant une photosensibilité prolongée de la peau suite à leur injection. De plus, la majeure partie de ces photosensibilisateurs est de nature hydrophobe. Ils ont donc tendance à fortement s'agréger en milieu aqueux ce qui réduit significativement leur efficacité photodynamique puisque seules les espèces monomères produisent des ROS (radicaux libres +  $^1O_2$ ) <sup>[117]</sup>. De plus, les molécules utilisées en PDT doivent être protégées contre la reconnaissance et la clairance opérée par le système réticuloendothélial durant leur phase de transport jusqu'aux cellules ciblées après injection <sup>[262]</sup>. Une des solutions pour remédier à ce problème est d'utiliser des nanoparticules comme agent de transport des molécules biologiques <sup>[3, 263]</sup>.

### I. 5. a. Généralités

Les nanotechnologies donnent lieu à des avancées majeures dans le domaine des énergies : pour la conception de cellules solaires économiques, la fabrication de batteries haute performance ; dans le domaine de l'électronique pour le stockage à haute densité de données informatiques et la fabrication de transistors à atome unique ; ou encore dans l'agriculture pour le relargage contrôlé d'engrais ainsi que pour permettre la traçabilité des polluants <sup>[3, 263, 264]</sup>. Cependant, les mots nanotechnologie et nanomédecine représentent des champs de recherche dont les définitions sont sujettes à controverses du fait d'une classification qui n'est pas universellement reconnue. La majeure partie des définitions des nanotechnologies utilisent le seuil de coupure dès 100 nm alors que les effets quantiques sont le plus souvent présents chez des objets dont les tailles varient de 1 nm à quelques dizaines de nanomètres

(Figure 91). Il arrive cependant que ces propriétés uniques soient présentes dans des nanomatériaux de taille supérieure à 100 nm comme, par exemple, pour des nanoparticules d'or de 150 nm dont l'effet plasmon (interaction entre la lumière et la matière) est étudié pour la thérapie thermique des cancers [265]. Les nanoparticules constituent une famille très vaste d'objets dont les propriétés chimiques et physiques sont directement reliées à leur taille extrêmement faible, leur forme volumique ainsi que leur composition (Figure 91). Leur taille et leur forme influencent leurs propriétés chimiques et leur confèrent une très haute réactivité de surface de plus, elles possèdent des propriétés optiques uniques qui sont directement reliées aux trois paramètres précédents. Grâce à leurs propriétés uniques, les nanotechnologies suscitent des intérêts croissants quant à leurs applications potentielles dans le domaine médical.

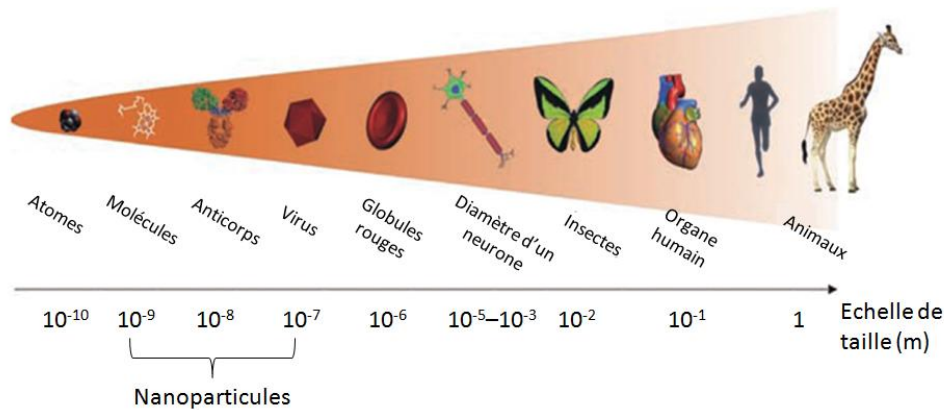


Figure 91 : Echelle relative de tailles des nanoparticules, adaptée de la référence [125].

## I. 5. b. Synthèse

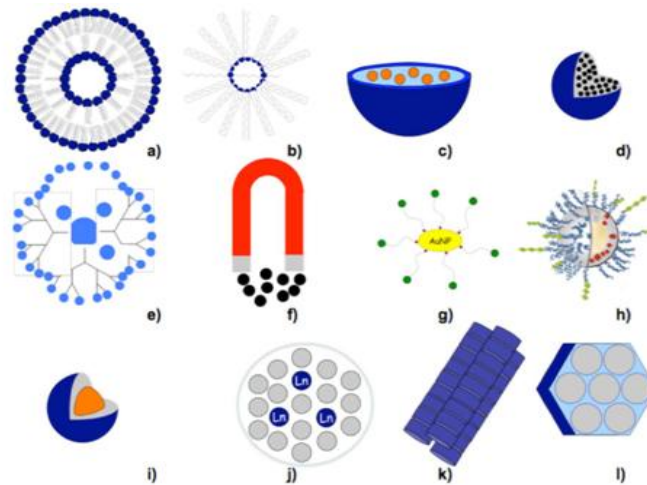
Afin d'obtenir des nanoparticules deux voies de synthèse sont majoritairement utilisées, le *Top-down* et le *Bottom-up* (Tableau 6).

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différentes techniques de synthèse des nanoparticules, d'après les références [266-268].

Voie de synthèse	Milieu de synthèse	Technique de synthèse	Principe de synthèse	Méthode employée	Exemple de nanoparticules obtenues
<b>Bottom-up</b> (création de nanoparticules en partant du niveau moléculaire)	Phase Gazeuse	Synthèse en phase gazeuse	Nucléation homogène obtenue à partir d'une vapeur sursaturée suivie d'une croissance des nanoparticules par condensation et collisions entre les nucléus	Pyrolyse par flamme	Silice évaporée ( <i>fumed silica</i> ), TiO <sub>2</sub>
				Réacteurs à flux haute température	Ag, Ga, Al, PbS, Pb, Si, Ge
				Vaporisation et pyrolyse obtenues par un laser	Silice, Fer
				Plasma couplé aux microondes	Métalliques, oxydes métalliques
				Pulvérisation	Métalliques
				Ablation laser	Carbone
	Dépôt de vapeur	Formation d'une vapeur suivie d'une réduction et d'une oxydation qui permettent de déposer la vapeur formée par îlots sur une surface	Pyrolyse	TiO <sub>2</sub> , ZnO, SiC, nanotubes de carbone	
	Phase liquide	Synthèse colloïdale (ou synthèse par voie humide)	Basée sur les procédés de précipitation en solution. Le contrôle des paramètres (T, P) permet d'obtenir des précipités insolubles. Le contrôle de la nucléation et de leur cinétique de croissance permet d'obtenir des particules de taille et de formes variées	En gros volumes ( <i>bulk volume</i> )	Métalliques, oxydes métalliques, nanoparticules organiques
				Systèmes confinés (Micelles, micelles inverses et microémulsion bicontinue)	
				Méthode à ultrasons (ou sonochimie)	
Synthèse polyol				Oxydes inorganiques [269]	
Méthode de l'autoassemblage moléculaire	Le contrôle de la taille et de la forme des nanoparticules se fait par le choix du bloc copolymère et par le choix du solvant et des conditions d'autoassemblage	Processus spontané de création de nanoparticules	Nanoparticules polymériques (obtenues à partir de blocs copolymères constitués de molécules amphiphiles)		
Interface solide-liquide	Nucléation à l'interface solide-liquide d'un système binaire	Construction de nanoparticules sur une surface solide à partir de sites de nucléation hétérogènes	Utilisation d'un support solide ( <i>patterned Surfaces</i> ) pour la nucléation et la croissance des nanoparticules sans pour autant affecter leur nature.	Nanoparticules métalliques (Au, Ag, Al, Cu)	
<b>Top-down</b> (Méthode de réduction mécanique)	Solide	Approche traditionnelle pour obtenir des nanoparticules fines : synthèse d'un alliage massif qui est ensuite réduit en morceaux	Broyage d'un alliage massif de composition chimique donnée ( <i>grinding, milling and alloying</i> )	Broyage effectué en présence de stabilisateurs de colloïdes pour éviter leur agrégation lors du processus de broyage	Fabrication de nanoparticules à partir de minéraux (ex : argile, charbon, métaux)

### I. 5. c. Les nanoparticules et la PDT

La conception de nanoparticules utilisables dans le domaine du traitement médical et plus particulièrement celui de la thérapie des cancers est un champ de recherche en plein essor. Les nanoparticules, après avoir été associées à différentes molécules médicamenteuses, servent de vecteurs à ces molécules d'intérêt thérapeutique. En ce qui concerne leurs applications en PDT, deux grandes familles de nanoparticules permettant d'adresser des molécules sont utilisées. Celles-ci regroupent les nanoparticules de type organiques (liposomes, nanoparticules polymériques, des nanomatériaux de carbone), les nanoparticules de type inorganiques (nanoparticules céramiques, nanoparticules d'or, quantum dots, nanoparticules magnétiques, des nanoparticules pour l'*up-conversion*)<sup>[117]</sup> (Figure 92).



Propriétés	Genre	Types	Numérotation
Biodégradables	Non polymériques	Liposomes	a)
	Polymériques	Polymériques	b)
		Capsules	c)
		Nanosphères	d)
		Dendrimère	e)
Non biodégradables	Passives	Magnétique	f)
		Métaux nobles (Au)	g)
		Multifonctionnelles à base de silice	h)
		Nanotubes	k)
		Zéolite	l)
	Actives	Quantum Dot	i)
		Nanoparticules à Up-conversion	j)

Figure 92 : Schémas des différents types de nanoparticules existantes, d'après la référence [3].

Un intérêt croissant est porté sur les nanoparticules dans le but d'augmenter la biodisponibilité des PS ainsi que de limiter leurs effets secondaires. Un point important de leur utilisation en PDT réside dans le fait que les nanoparticules peuvent être de très faible taille ce qui les rend furtives vis-à-vis du système immunitaire. Elles sont donc faiblement retenues et éliminées par le système réticuloendothélial par rapport à leurs homologues moléculaires, ce qui leur confère un plus long temps de circulation *in vivo* et donc une meilleure biodistribution.

Les nanoparticules possèdent un grand rapport surface/volume qui permet d'avoir une charge importante de fonctionnalisation par des molécules de ciblage et de thérapie <sup>[265]</sup>. Cette grande surface de contact leur confère un fort potentiel pour le relargage de molécules actives dans des zones spécifiques si des ligands de ciblage sont utilisés.

Les molécules thérapeutiques peuvent être ajoutées aux nanoparticules de façon covalente ou non. Ainsi, dans le cas de l'utilisation de nanoparticules, deux grandes stratégies ont été développées pour administrer les photosensibilisateurs :

- **L'encapsulation**

La première correspond à l'encapsulation pour laquelle le photosensibilisateur est incorporé à l'intérieur des nanoparticules ou bien il est mélangé à l'enveloppe des nanoparticules de type *core-shell*, ce qui permet de conserver la structure chimique originelle de ces molécules et par conséquent leur efficacité thérapeutique.

- **Le greffage covalent**

La deuxième méthode consiste à conjuguer les photosensibilisateurs dans la couche protectrice des nanoparticules ou à les lier avec les molécules fixées à la surface des nanoparticules inorganiques. La conjugaison covalente demande des modifications chimiques des molécules pour les lier aux nanoparticules, ce qui peut potentiellement réduire leur efficacité thérapeutique <sup>[262]</sup>. Cependant, elle présente plusieurs avantages en comparaison de l'encapsulation. Le greffage d'un PS sur une nanoparticule permet d'utiliser celle-ci pour des applications autres que le simple transport des photosensibilisateurs (IRM, imagerie par fluorescence, théranostic, hyperthermie, PDTX (*X-Ray PhotoDynamic Therapy*)). De plus, un nombre réduit de photosensibilisateurs greffés par nanoparticule permet de conserver ces molécules à l'état monomère évitant ainsi le phénomène de *quenching* et donc la perte de production d'<sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Enfin, les molécules photoactives ne nécessitent pas d'être relarguées pour interagir avec les cellules et les tissus à détruire puisqu'il suffit que l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> généré lors de l'irradiation du photosensibilisateur puisse diffuser de la nanoparticule vers les cellules dégénérantes <sup>[117, 143]</sup>. En prenant en compte ces considérations, il apparaît donc que le meilleur choix consiste à utiliser une stratégie de conjugaison covalente des PS avec les nanoparticules <sup>[262]</sup>. De plus, les nanoparticules offrent une protection mécanique contre la dégradation enzymatique des photosensibilisateurs en milieu biologique <sup>[80]</sup>. Elles permettent donc d'augmenter significativement la durée de vie et le temps de circulation des PS *in vivo* <sup>[270]</sup>.

La possibilité de modifier la surface des nanoparticules en font des agents intéressants dans le domaine du ciblage actif et du ciblage passif des tumeurs cancéreuses puisque cela permet d'augmenter la biocompatibilité des nanoparticules par leur enrobage dans une couche biocompatible que l'on peut obtenir suivant deux méthodes : la synthèse monocouche et multicouche et l'enrobage avec des biomolécules <sup>[265, 271]</sup>. Malgré tous ces avantages, il est important de noter que contrairement aux molécules classiques, l'utilisation de nanoparticules comme vecteurs de médicaments ajoute de nouvelles contraintes d'utilisation telles que leur dissolution, leur agrégation, leur compatibilité en milieu biologique du point de vue de leur composition chimique, de leurs propriétés physiques, de leur taille et de leur forme ainsi que de leur mode d'élimination <sup>[272]</sup>.



Nous allons brièvement décrire les principaux types de nanoparticules étudiées pour des applications potentielles en PDT. A la fin de ce chapitre, nous incluons une revue sur les nanoparticules pour la PDT écrite en 2011 et un chapitre de livre traitant des nanoparticules de silice, écrit en 2013.

### **I. 5. c. i. Les nanoparticules organiques**

#### **• Les polymères**

La première synthèse de nanoparticules de polymères conjuguée à un photosensibilisateur a été effectuée en 1992 par l'équipe de Kopecek. Ils ont couplé une chlorine ( $Mce_6$ ) à des copolymère de *N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide (HPMA). La  $Mce_6$  a été couplé par l'intermédiaire d'une chaîne oligopeptidique (G-F-L-G) lié aux chaînes latérales du copolymère et dégradable par des enzymes. Depuis, d'autres études <sup>[273]</sup> ont porté sur l'élaboration de nanoparticules à base de polymères en particulier de type PLA, PLGA (copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique, un mélange d'acide polylactique (PLA) et d'acide polyglycolique (PGA)) <sup>[274]</sup> et des études récentes s'intéressent à des polymères naturels <sup>[275]</sup>.

#### **• Les micelles**

Les micelles correspondent à la façon la plus basique d'encapsuler des molécules. Cette encapsulation s'effectue par la formation de micelles de blocs copolymère suivant la méthode de l'évaporation de solvant. Les copolymères utilisés sont un assemblage entre un polymère hydrophobe et un polymère hydrophile. Ce type de polymère a déjà été utilisé, mélangé avec des photosensibilisateurs (ex : poly(propylène glycol) avec le Foscan®) <sup>[276]</sup>. Afin d'encapsuler des molécules hydrophobes dans les micelles, celles-ci peuvent être soit directement ajoutées à la solution de polymères (Figure 93.A) soit fixées à la partie hydrophobe du polymère puis les micelles sont formés suivant la méthode précédemment décrite (Figure 93.B) <sup>[276, 277]</sup>. Ce type de nanoparticules permet, après leur internalisation par les cellules tumorales, de relarguer le photosensibilisateur qu'elles contiennent.

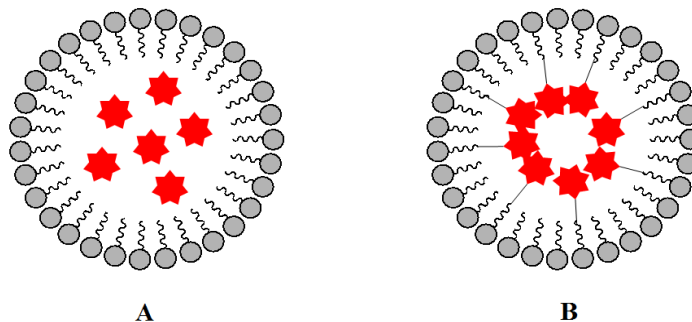


Figure 93 : Schémas d'encapsulation d'un photosensibilisateur dans des micelles.

#### **• Les liposomes**

La première mise en évidence de la formation de liposomes a été observée par Bangham dans les années 1960. Alors qu'il travaillait sur l'étude des membranes biologiques, il observa de la lécithine d'œufs (ou phosphatidylcholine) au microscope en présence d'eau et il s'aperçut que celles-ci s'organisent en forme de frondes lorsqu'elles sont mises au contact de l'eau <sup>[278]</sup>. Les liposomes sont des structures lipoïdales organisées en vésicules et composées d'au moins une double couche de lipides. Ces lipides amphiphiles sont le plus souvent des phospholipides ou du cholestérol dont la structure est constituée d'une queue hydrophobe fixée à une tête hydrophile. Ils s'organisent, après dissolution dans l'eau, par attraction mutuelle entre les queues hydrophobes et par mise en contact des têtes hydrophiles avec la phase

aqueuse (Figure 94.A) <sup>[279]</sup>. L'utilisation du cholestérol permet d'augmenter la stabilité de la paroi liposomale en présence de fluides biologiques et elle permet d'en augmenter la rigidité réduisant ainsi sa perméabilité vis-à-vis des molécules encapsulées <sup>[280]</sup>. Il existe deux types de liposomes qui comprennent les liposomes unilamellaires (SUV ou *Small Unilamellar Vesicle* et LUV ou *Large Unilamellar Vesicle*) et les liposomes multilamellaires (MLV ou *Multilamellar Vesicle*) (annexes Tableau 22). Les liposomes unilamellaires sont des vésicules composées d'une seule paroi sphérique formée par deux couches de phospholipides renfermant une solution aqueuse (Figure 94.B). Elles sont composées de dérivés de phospholipides naturels associées à des mélanges de chaînes lipidiques (ex : phosphatidyléthanolamine d'œuf) ou des composés purs comme la DOPE (dioléolylphosphatidyléthanolamine). Cette bicouche lipidique est ensuite capable de fusionner avec d'autres bicouches comme les membranes cellulaires, par exemple, ce qui permet de relarguer le contenu des liposomes et donc de les utiliser pour faire entrer des molécules thérapeutiques ou du matériel génétique dans les cellules. Les liposomes multilamellaires sont des vésicules multicouches possédant une structure en oignon (Figure 94.C). Ils sont classiquement composés de plusieurs vésicules unilamellaires formées les unes à l'intérieur des autres avec des tailles décroissantes ce qui crée une structure concentrique de sphères de phospholipides séparées par des couches de solution aqueuse <sup>[279]</sup>.

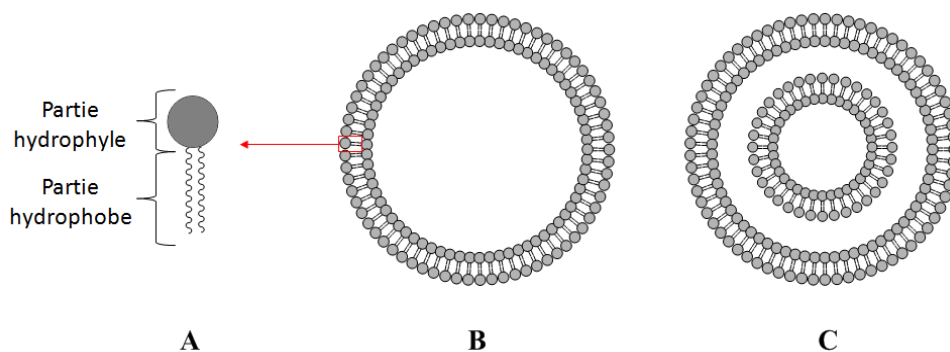


Figure 94 : Schéma d'une molécule lipidique (A), d'un liposome unilamellaire (B) et d'un liposome multilamellaire (C).

Afin d'obtenir les liposomes, de multiples techniques de synthèse ont été développées et sont résumées en annexe dans le Tableau 22.

Les liposomes peuvent alors interagir de quatre manières différentes avec les cellules, par endocytose par les cellules phagocytiques, par adsorption à la surface des cellules, par fusion avec la membrane plasmique cellulaire par insertion de la bicouche dans la membrane, par transfert des lipides aux membranes cellulaire ou subcellulaire. Il y a donc un grand intérêt à créer des liposomes dont la structure lipidique est la plus proche possible de celle des cellules vivantes (structure, composition, proportions en différents lipides) afin de permettre la fusion de la paroi de ces nano-objets avec la membrane cellulaire permettant ainsi de relarguer les molécules encapsulées à l'intérieur de la cellule.

#### • Les nano-objets à base de carbone

Les nanotubes de carbone (CNT pour *carbon nanotube*) ont été découverts en 1991 par Iijima. Ce sont des matériaux constitués uniquement de carbone de type  $sp^2$  <sup>[281]</sup>. Ils sont constitués de couches de carbones enroulées sur elles-mêmes et organisées suivant des structures de type cycles benzéniques. Dans le cas d'un cristal monoplan et donc bidimensionnel (feuille), on parle de graphène. Lorsque cette feuille forme un volume non plan, on parle de fullerène. Les nanotubes sont classés dans la même famille que les fullerènes qui fait elle-même partie des trois formes allotropiques du carbone dont les deux autres sont : le graphite et le diamant <sup>[282]</sup> (Figure 95).

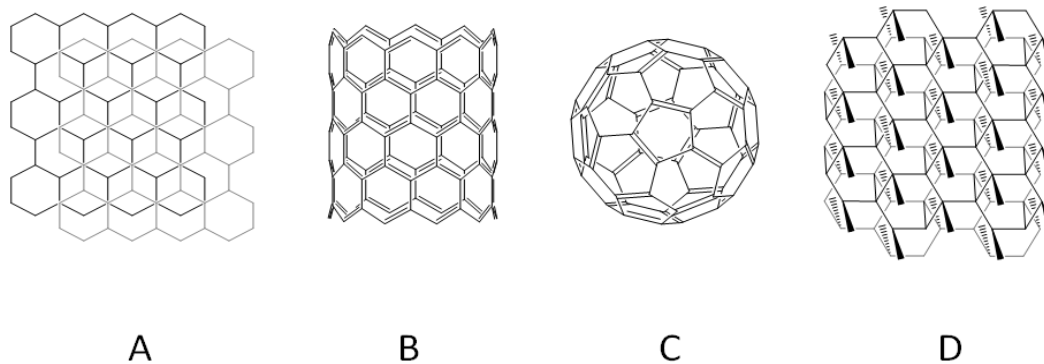


Figure 95 : Structure chimique de quatre structures de carbones : A. Graphite ; B. SWCNT (*single-walled carbon nanotube*) ; C. Fullerène ; D. Diamant.

Il existe plusieurs types de nanotubes se différenciant par le nombre de feuilles de graphène qui les constituent. Ils peuvent être formés soit par une simple paroi de graphène (*single-walled nanotube* [SWNT]), soit par des couches multiples concentriques (*multiple-walled nanotube*) [MWNT]) (Figure 96). Les SWCNT ont un diamètre compris entre 1,3 et 1,6 nm pour une longueur de plusieurs  $\mu\text{m}$  [271] avec une densité de l'ordre de  $0,36 \text{ g.cm}^{-3}$ . Les MWCNT ont, quant à eux, une densité qui varie de 1 à  $2 \text{ g.cm}^{-3}$  [283].

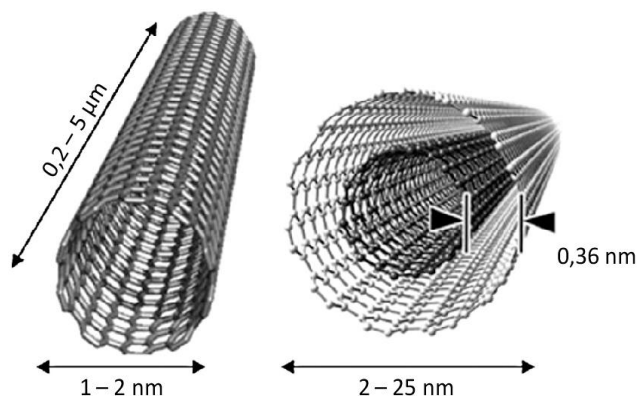


Figure 96 : Modélisation de deux nanotubes de carbone : SWCNT (à gauche) et MWCNT (à droite), adapté de la référence [284].

Pour obtenir les nanotubes de carbone, plusieurs techniques de synthèse peuvent être utilisées et sont résumées en annexe dans le Tableau 23.

Les nanotubes de carbone sont utilisables, pour la thérapie photodynamique, seuls ou après avoir été couplés à des photosensibilisateurs [261, 285-288].

### I. 5. c. ii. Les nanoparticules inorganiques

#### • Les puits quantiques (quantum dots)

Ces nano-objets sont couramment composés d'atomes des groupes II-VI (ex : CdSe, CdTe, CdS, ZnSe), III-V (InP, InAs), IV-VI (PbSe) du tableau périodique des éléments [289] et sont également nommés nanocristaux semi-conducteurs (NCs) du fait de leurs propriétés particulières [290]. Ils sont constitués de quelques centaines à quelques milliers d'atomes métalliques qui forment un monocristal possédant la structure cristalline des métaux et dont les tailles s'étendent entre 2 et 10 nm [3, 289-292]. Elles possèdent

des propriétés électroniques et optiques uniques dues à la création d'une paire électron-trou à leur surface ( $e^-$  ;  $h^+$ ) (Figure 97) et qui ne sont présentes ni au niveau atomique ni dans les molécules constitutives de base et les cristaux massifs.

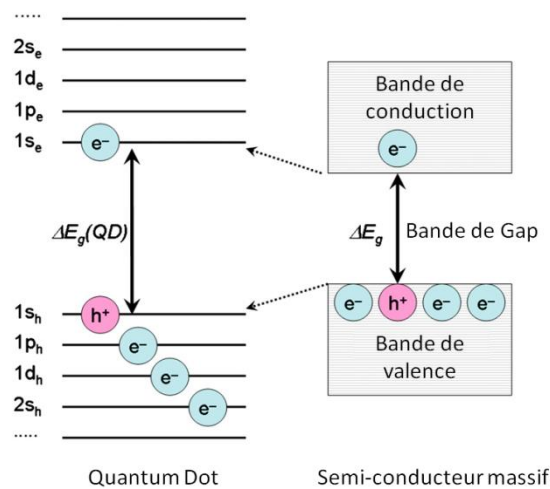


Figure 97 : Schéma des niveaux électroniques possibles dans les QD et dans les semi-conducteurs massifs, adapté de la référence [290].

Ceci est dû à un effet de confinement quantique qui intervient dans le cas de nanoparticules dont les tailles sont inférieures au rayon de l'exciton de Bohr (soit environ 1 à 5 nm) <sup>[3, 290]</sup> et qui devient très important lorsque les dimensions de confinement augmentent et que la taille de la structure décroît. Ainsi, après excitation, ces nanomatériaux fluorescent à une longueur d'onde d'émission qui est directement liée à la taille des QD, elle-même contrôlable lors de la synthèse <sup>[3]</sup> (Figure 98). De plus, ils possèdent un fort coefficient d'extinction molaire (jusqu'à  $5 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) et leur spectre d'émission de fluorescence est composé d'un seul pic d'émission symétrique <sup>[292]</sup>.

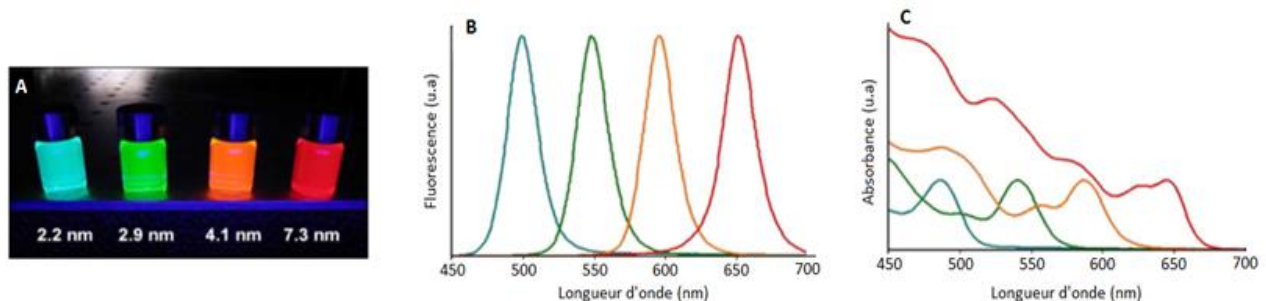


Figure 98 : A. Photographie de la fluorescence de QD suivant leurs tailles sous excitation UVB ; B. Spectre de fluorescence des différents QD ; C. Spectres d'absorption des QD selon leur taille, adaptés de [293].

L'avantage majeur par rapport aux marqueurs fluorescents organiques est qu'ils possèdent une grande brillance (meilleur rapport signal/bruit) avec un rendement quantique de fluorescence proche de 1 ainsi qu'une très grande résistance au photoblanchiment (pas de perte d'émission de fluorescence malgré une excitation prolongée) <sup>[3, 292]</sup>. Les QD possèdent des niveaux d'énergie de l'ordre de 1 à 5 eV ce qui fait de ces semi-conducteurs des photosensibilisateurs potentiels <sup>[290]</sup>. Ils sont étudiés dans le cadre de la thérapie anticancéreuse pour la photosensibilisation et la radiosensibilisation (Figure 99) <sup>[290]</sup>.

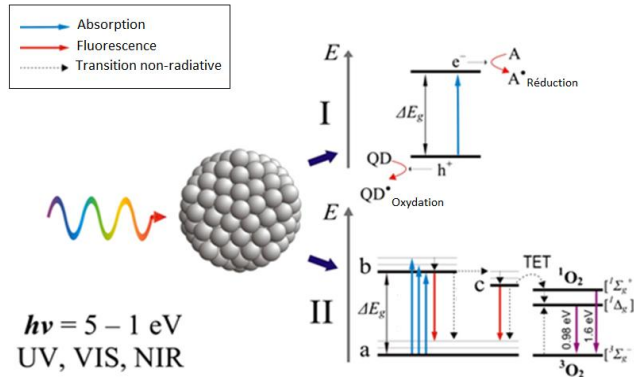


Figure 99 : Mécanismes de transferts d'énergie associés au QD suite à une excitation dans le domaine du visible, adapté de la référence [290].

Une excitation avec des longueurs d'onde de très haute énergie aurait pour effet d'arracher des électrons aux QD, permettant ainsi un transfert électronique avec son environnement (Figure 100). De plus, du fait de leurs fortes densités atomique et électronique, les QD peuvent jouer le rôle d'absorbants de photons de haute énergie (rayons gamma et rayons X) et ainsi servir de radiosensibilisateurs locaux permettant d'endommager des cellules cancéreuses de façon localisée [290].

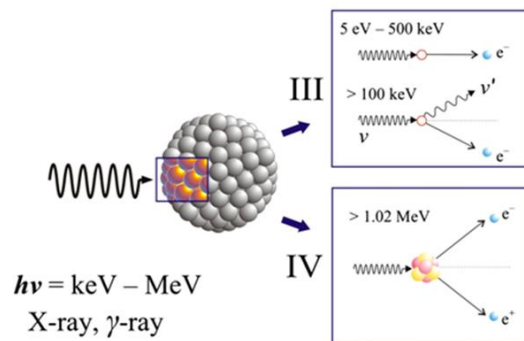


Figure 100 : Mécanismes de transfert d'énergie s'opérant après excitation d'un QD avec un rayonnement de très haute énergie, adapté de la référence [290].

Morosini et al. ont synthétisé des QD CdTe fonctionnalisés avec de l'acide folique (FA pour *folic acid* ou vitamine B9) par l'intermédiaire de deux bras espaceurs  $\alpha,\omega$ -poly(éthylène glycol) différents. Ils ont testé la cytophototoxicité de ces QD sur des cellules KB et HT-29, les cellules KB surexprimant le récepteur FR- $\alpha$  et HT-29 n'exprimant pas FR- $\alpha$ . Les nanoparticules CdTe@TGA-PEG2-FA ont montré un effet cytophototoxique notable pour une concentration de 100 nM après un temps d'exposition de 6 heures. De plus, pour une concentration de 5 nM pendant 3 heures d'incubation sous irradiation, elles ont montré une DL  $\leq 50$  à partir d'une fluence de  $10 \text{ J.cm}^{-2}$  [292]. Plus récemment, Tekdas et al. (2012) rapportent la synthèse de QD CdTe-TGA couplés à différents types de phtalocyanines métallées afin de tester l'effectivité et l'efficacité du transfert d'énergie par FRET. Ils ont montré indirectement la production d' $^1\text{O}_2$  par les phtalocyanines conjuguées aux QD en étudiant les propriétés photochimiques des PS en présence de 1,4-benzoquinone (*quencher*) [294]. Hsu et al. (2013) ont, quant à eux, rapporté le couplage de la *m*-THPC à des QD sur lesquels est greffée une enzyme, la *Renilla luciferase 8* (RLuc8). Le principe consiste à exposer l'enzyme à son substrat (la coéluentérazine) afin d'obtenir un transfert d'énergie (BRET ou *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) depuis le complexe « enzyme-substrat » vers le QD qui va ensuite transférer cette énergie à la *m*-THPC. Ils ont ainsi traité des souris greffées avec

des cellules tumorales de type A549 auxquelles ils ont injecté les RLuc8-*m*-THPC ainsi que le substrat puis ils ont constaté une faible augmentation de la taille des tumeurs traitées en fonction du temps (20 jours) [290, 295].

### • Les nanoparticules d'oxyde de fer magnétique et supramagnétique

Elles sont formées d'un noyau métallique magnétiquement actif (fer, nickel, cobalt) obtenu suivant différentes stratégies de synthèse [296, 297] (annexes Tableau 24). Elles sont constituées le plus souvent des phases oxydes de structures Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnétite) et α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (hématite), γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghémite), FeO (wüstite), ε-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et β-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Cependant, la magnétite et la maghémite sont les deux meilleurs candidats pour l'élaboration de nanoparticules d'oxyde de fer [298].

Les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques et d'oxyde de fer superparamagnétiques sont utilisées pour le ciblage magnétique cellulaire ou comme agents de contraste pour l'imagerie IRM [299] car elles présentent l'avantage de donner un effet de réhaussement de contraste en imagerie par résonance magnétique. Cette propriété provient des domaines de Weiss (domaines magnétiques) qui les composent et qui correspondent à des régions de tailles restreintes (≤ 1 nm) de l'oxyde où tous les moments magnétiques atomiques (ou spin) sont alignés parallèlement les uns aux autres. Ceci induit une aimantation locale homogène qui varie en fonction de la température et du champ magnétique dans lequel se trouve le matériau [300]. Les ions Fe<sup>2+</sup> qui peuvent être relargués de ces nanoparticules présentent un caractère cytotoxique, ce qui nécessite de les enrober afin de limiter leur toxicité [300]. Afin de passiver la surface de ces nanoparticules, il est possible d'utiliser différents polymères et biomolécules sur la surface des nanoparticules par la technique des couches (*layer-by-layer*), ce qui permet d'obtenir un enrobage composite aux propriétés souhaitées [298]. Ceci permet donc de les utiliser en temps que plateformes pour la vectorisation de molécules dans le cadre de la PDT [300-304].

Primo et al. (2007) ont développé des nanoparticules d'oxyde de fer magnétique, faite de maghémite (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), fonctionnalisées avec des phosphates (surfactants) dont ils se sont servis pour créer une émulsion huile-eau où du Foscan® était contenu dans l'huile. L'application topique de cette solution a montré une diffusion du Foscan® par voie cutanée dans l'épiderme et le derme. Ils n'ont cependant pas procédé au traitement PDT [301]. En 2011, une nanoparticule d'oxyde de fer magnétique d'environ 20 nm enrobée d'une couche de siloxane sur laquelle a été fixée la chlorine e6 (Ce6) par liaison covalente a été développée par Huang et al., en vue de traiter les cancers gastriques [303]. Ces nanoparticules ont montré, après injection intraveineuse, une efficacité dans le contrôle du développement des cellules tumorales gastriques chez la souris [303]. Dans des études plus récentes, Lee et al. (2012) ont couplé de la chlorine Ce6 avec du PLGA, du mPEG, et du PLGA. Ils ont ensuite fonctionnalisé des nanoparticules d'oxyde de fer à l'aide de ces deux assemblages afin d'obtenir des nanoparticules multifonctionnelles. Ces nanoparticules ont ensuite été testées sur des souris portant des tumeurs greffées. Après traitement PDT (irradiation à 670 nm et 5,2 mW.cm<sup>-2</sup> pendant 40 minutes), les tumeurs ont montré une diminution de taille nette en présence de Np-Ce6 et de Ce6 et légèrement supérieure pour les Np-Ce6 par rapport à la Ce6 seule [302].

### • Les nanoparticules d'or

L'or colloïdal était à l'origine utilisé pour colorer le verre et la porcelaine. Ce n'est qu'aux environs de 1850 que Faraday commença à les étudier. Depuis 20 ans, les nanoparticules d'or (Au NPs) aux propriétés physiques et chimiques spécifiques font partie des nanostructures les plus étudiées. Afin d'obtenir ces nano-objets, deux méthodes de synthèse classiques ont été mises au point et sont les plus fréquemment employées [262]. La première méthode de synthèse développée par Turkevich et al. en 1951



consiste à préparer les nanoparticules par réduction du  $\text{HAuCl}_4$  en présence de citrate de sodium dans de l'eau à reflux. Cette méthode permet d'obtenir des nanoparticules dont les tailles moyennes sont d'environ 20 nm mais pour lesquelles il est possible d'atteindre 150 nm en changeant le ratio or/citrate [262, 265]. Dans la seconde méthode, développée par Brust et al. en 1994, les ions  $\text{AuCl}_4^-$  sont réduits par le tétrahydroborate de sodium en présence de thiols (R-SH) dans un système biphasique (eau/toluène). Un *capping* est ainsi obtenu avec les thiols, ce qui permet d'avoir des nanoparticules d'or stables [206, 262, 265].

Le contrôle de la croissance de ces nanoparticules permet d'obtenir, en plus des nanoparticules sphériques, une multitude de nano-objets de tailles et de formes très différentes tels que : les *nanorods*, les *nanoshells*, les *nanocages* et les *nanotubes* [305] (Figure 101).



Figure 101 : Schémas des différents types de nanoparticules, d'après la référence [305].

La propriété la plus intéressante de ces nanoparticules est appelée résonance de plasmon de surface (SPR pour *Surface Plasmonic Resonance*) [306] (Figure 102). Celle-ci est induite par les dimensions à l'échelle nanométrique et elle n'est présente ni au niveau atomique ni au niveau massif. Elle se caractérise par une bande d'absorption UV-visible dans le domaine du rouge qui se déplace vers les plus courtes longueurs d'onde en fonction de la diminution de taille, de la forme, de la température, du solvant de dispersion mais aussi de la distance entre les nanoparticules [307, 308]. Cette propriété optique unique est due à l'oscillation collective des électrons qui se trouvent à la surface des nanoparticules stimulées par un champ électromagnétique externe, ce qui permet leur utilisation pour le diagnostic [206, 262].

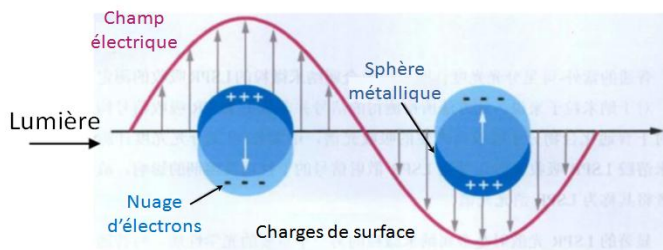


Figure 102 : Schéma de la résonance électronique de plasmon de surface, adapté de la référence [309].

De part leur photostabilité, les nanoparticules d'or peuvent servir à vectoriser des molécules pour la PDT. En effet, l'interaction entre la radiation incidente et la résonance électromagnétique (oscillation collective des électrons de la bande de conduction) du métal noble induit un large champ électrique de surface qui, par une augmentation de la section efficace d'absorption (*scattering cross section*), favorise la résonance de plasmon et donc les propriétés radiatives des nanomatériaux. Du fait de l'interaction

entre les nanomatériaux métalliques et l'état excité des fluorophores, les électrons libres du métal oscillent avec ceux du fluorophore associé (phtalocyanine <sup>[260]</sup>, bleu de méthylène <sup>[310]</sup>), ce qui reproduit le comportement d'un dipôle augmentant l'absorption et les propriétés photophysiques du fluorophore qui leur est couplé <sup>[158, 260, 310]</sup>. Narband et al. ont montré que des thiazines cationiques (bleu de toluidine O (TBO) et le bleu de méthylène) ont une forte interaction avec les nanoparticules d'or (augmentation de leur absorption UV-visible). Il en résulte une efficacité antibactérienne par effet PDT du TBO couplé aux nanoparticules d'or supérieure à celle du TBO seul, avec un taux de destruction du *Staphylococcus aureus* de 90% à 99% <sup>[310]</sup>. Une autre équipe, celle de Khan et al. a, quant à elle, étudié l'effet du bleu de méthylène en présence de nanoparticules d'or sur des biofilms de *Candida albicans*. Les nanoparticules qu'ils ont utilisés montrent également une interaction avec le photosensibilisateur, ce qui augmente les propriétés d'absorption UV-visible du PS <sup>[310]</sup>. Il en résulte une plus forte destruction cellulaire en présence de nanoparticules et de bleu de méthylène, après irradiation, par rapport au PS seul.

#### • Les nanoparticules à base de lanthanides

Elles présentent l'avantage de présenter un caractère paramagnétique qui implique qu'elles peuvent être utilisées en temps qu'agent de contraste positif pour l'imagerie IRM <sup>[311]</sup> et une luminescence due aux lanthanides qui les constituent, offrant ainsi une alternative intéressante pour l'imagerie de résonance et la photoluminescence <sup>[311]</sup>.

Les nanoparticules de lanthanides peuvent être classées en 3 familles :

##### - Oxydes simples (pour l'IRM et RX)

Ces nanoparticules ne sont pas développées dans cette partie car il s'agit d'oxydes de métaux dont le principal intérêt réside dans leur utilisation en imagerie mais ils ne sont pas reliés directement à la PDT.

##### - Oxydes dopés pour la fluorescence obtenue par down-conversion ou photon-cutting (excitation monophoton)

Les différentes méthodes de synthèse utilisées pour obtenir ces nanoparticules fluorescentes sont la méthode sol-gel, la méthode d'émulsion et la méthode de précipitation <sup>[312]</sup>. Il a été montré que les propriétés de fluorescence de ces nanoparticules dépendent fortement de la localisation des atomes de dopant à l'intérieur des nanostructures. De plus, cette localisation est fortement liée à la technique de synthèse utilisée pour obtenir les nanoparticules <sup>[312]</sup>. Ce type de nanoparticules permet de convertir des photons de haute énergie, souvent situés en dehors du domaine du visible, en photons de plus faible énergie et se trouvant dans le domaine du visible <sup>[311, 313]</sup>. On parle alors de « *Quantum Cutting* » dont le principe est de convertir un photon de haute énergie en plusieurs photons de plus faibles énergies que celle du photon incident <sup>[314-317]</sup> (Figure 103).



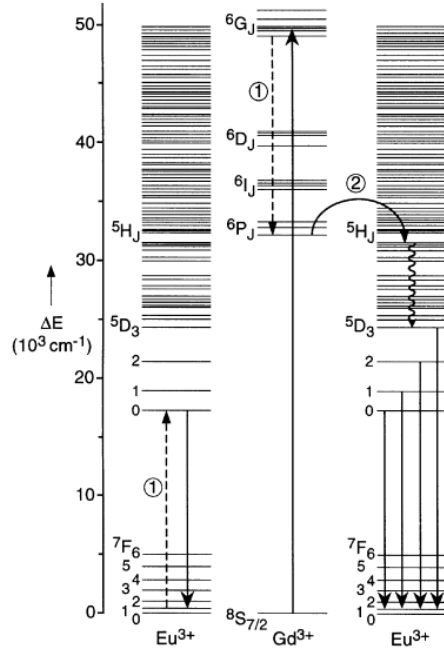


Figure 103 : Diagramme des niveaux d'énergie d'un système  $Gd^{3+} - Eu^{3+}$  montrant la possibilité du « Quantum Cutting », d'après la référence [317].

Ce type de nanoparticules couplées à la radiothérapie est envisageable pour la PDT car elle permet d'exciter le cœur avec des rayons X qui seront convertis en rayonnement UV-visible qui sera à son tour absorbé par le photosensibilisateur fixé sur la nanoparticule [318, 319]. La nanoparticule sert alors d'agent de conversion énergétique (ou transducteur) pour l'excitation du photosensibilisateur (Figure 104) [4, 320].

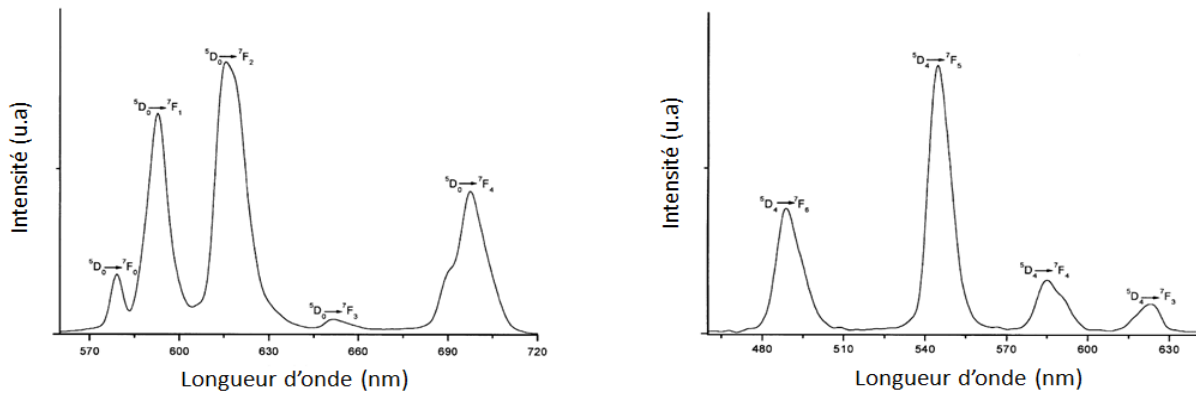


Figure 104 : Spectres d'émission de nanoparticules  $Gd_2O_3:Eu^{3+}$  (2%) (à gauche) et  $Gd_2O_3:Tb^{3+}$  (2%) (à droite) excitées à 336 nm, adapté de la référence [321].

Ces nanoparticules peuvent également être co-dopées avec un lanthanide autre de celui qui va émettre dans l'UV-visible (ex :  $Eu^{3+}$  et  $Tb^{3+}$ ). Cette méthode permet d'avoir une augmentation de fluorescence de la nanoparticule sans changer son spectre d'émission ni nécessiter d'augmenter la concentration en ion lanthanide qui va fluorescer. En effet, une concentration trop importante en dopant est néfaste pour son intensité de fluorescence car celui-ci va se désexciter par un mécanisme d'*auto-quenching* [322]. Lors de l'excitation, le photon incident est de haute énergie et va ainsi donner lieu à un processus de *down-conversion* par FRET. Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) est un processus de

transfert d'énergie non-radiatif dans lequel l'énergie est transférée depuis un état excité donneur vers un accepteur se trouvant à un état fondamental d'énergie proche de celui du donneur.

- **Oxydes dopés pour la fluorescence obtenue par l'*up-conversion* (multiphoton)**

Ces nanoparticules également nommées UCNP (*lanthanide-doped up-conversion nanoparticles*) peuvent être synthétisées de plusieurs façons : par la méthode de co-précipitation, par la décomposition thermique, par procédé sol-gel, par la méthode dite hydro (solvo) thermique<sup>[323]</sup>. Ces nanoparticules sont constituées d'une matrice transparente qui est composée d'oxydes, le plus souvent, de lanthanides :  $Y_2O_3$ ,  $Lu_2O_3$ ,  $Gd_2O_3$ ,  $GdPO_4$ ,  $MnO$ <sup>[311, 324]</sup> mais on trouve également des sulfures et des halogénures de lanthanides  $GdS$ ,  $GdF_3$ <sup>[311]</sup>,  $NaYF_4$ . Le choix de ce type de matrice vient du fait que ces oxydes possèdent la même structure cristalline avec des paramètres de mailles quasiment identiques avec des valeurs des constantes de lattice très proches<sup>[323, 325]</sup>. Ces matrices oxydes sont co-dopées avec un ou plusieurs autres lanthanides qui vont alors se trouver incorporés dans la structure sous la forme d'un ion trivalent  $Ln^{3+}$ . Elles doivent comporter un ion lanthanide trivalent jouant le rôle d'activateur (typiquement  $Yb^{3+}$ ) et un lanthanide jouant le rôle de centre d'émission lumineuse (ex :  $Er^{3+}$ ) (Figure 105). Il s'opère alors un transfert d'énergie depuis le lanthanide donneur vers l'accepteur approprié. Lors de l'irradiation, les ions dopants passent chacun leur tour dans un état excité métastable. L'ion absorbeur, du fait de sa grande section efficace d'absorption, va passer de son état fondamental à un état excité pour ensuite retourner à son état fondamental en transférant son énergie, de façon non-radiative, à un ion accepteur. Les ions accepteurs vont alors atteindre un état de plus haute excitation pour ensuite redescendre à leur état fondamental avec l'émission d'un photon de plus haute énergie dont la longueur d'onde se trouve dans le spectre UV-visible<sup>[157, 326]</sup>. L'activateur doit donc posséder une section efficace suffisamment grande à la longueur d'onde d'excitation souhaitée et il doit pouvoir transférer efficacement cette énergie au centre de luminescence. L'ion luminescent doit, quant à lui, posséder un niveau d'énergie métastable qui a un temps de vie à l'état excité suffisamment long. Le mécanisme d'*up-conversion* se fait alors avec deux photons de faible énergie (infra rouge)<sup>[326]</sup>. Ce processus est nommé « *luminescence resonance energy transfer* » (LRET)<sup>[327]</sup>. La présence de ces impuretés confère ainsi des propriétés originales à ces objets. La propriété principale de ces nanoparticules réside dans le fait que le co-dopage permet de les exciter avec une source lumineuse dont la longueur d'onde se situe dans le proche infrarouge ( $\approx 1000$  nm) et par conséquent dans la fenêtre thérapeutique pour donner des longueurs d'ondes d'émissions situées dans l'UV et le visible<sup>[325]</sup>. Elles permettent ainsi d'obtenir une luminescence par *up-conversion* qui est un processus optique non-linéaire qui, par effet de pompe, converti plusieurs photons (deux ou plus) de faible énergie (provenant de la région infrarouge du spectre lumineux) en un photon émis avec une longueur d'onde plus courte et donc d'énergie plus élevée<sup>[328]</sup> par rapport aux photons incidents. Les matériaux fluorescents à *up-conversion* possèdent également de nombreux avantages par rapport à la *down-conversion*, ils possèdent des raies d'absorption et des bandes d'émission bien définies. De plus, leur domaine d'absorption situé dans le proche infrarouge permet d'avoir une plus forte pénétration que pour les matériaux à *down-conversion* classique de plus, leur auto-fluorescence est faible et ils possèdent un ratio signal/bruit très élevé. Un point clé des ces nanoparticules provient du fait que la quantité (en mol%) des atomes dopants peut être ajustée pour d'obtenir la fluorescence la plus intense possible et éviter un phénomène de *quenching* dû à une trop grande proportion en scintillateur<sup>[325]</sup>. En effet, lorsque la quantité du lanthanide luminescent utilisé pour le dopage augmente jusqu'à un certain seuil, il se produit un *quenching* de fluorescence du fait d'une relaxation croisée ou migration d'énergie entre centres de *quenching*/de fluorescence ( $Ln^{3+}$ ) qui est dûe à une forte diminution du temps de vie de fluorescence du dopant. Du fait de la faible distance entre ces atomes, il se crée un réseau qui rend les interactions possibles entre les centres de fluorescence très proches qui vont alors se désexciter par résonance non-radiative, ce qui réduit leur temps de vie à l'état excité et donc diminue fortement leur

durée de fluorescence. L'énergie d'excitation est alors perdue de façon non-radiative <sup>[311, 312]</sup> (Figure 106). Les interactions mutuelles qui conduisent au *quenching* de luminescence dans les matériaux à l'état solide sont reliés par la relation de proportionnalité:

$$I \propto C^{(1-\frac{s}{3})}$$

; où I est l'intensité relative d'émission, C la concentration en dopant Ln<sup>3+</sup>, s la constante d'interactions mutuelles. Le *quenching* de luminescence est ainsi relié à la résonance multipôle de transfert électrique entre deux Ln<sup>3+</sup> proches et donc à leurs échanges par interaction <sup>[312]</sup>.

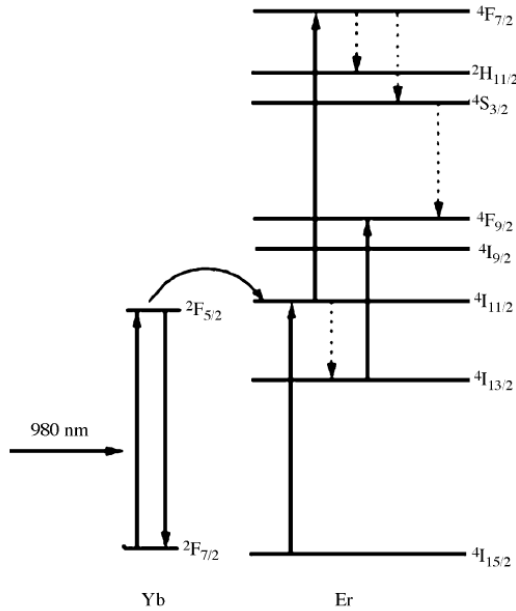


Figure 105 : Diagramme des niveaux d'énergie lors de l'émission par *up-conversion* de nanoparticules Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Er<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> excitées à 980 nm, d'après la référence [326].

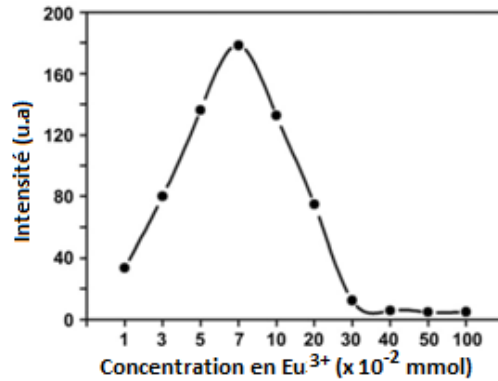


Figure 106 : Spectre d'émission de nanoparticules dopées en fonction de la concentration en Eu<sup>3+</sup>, adapté de la référence [311].

Comparée aux sondes fluorescentes classiques qui sont basées sur un principe de *down-conversion* énergétique, l'imagerie par *up-conversion* à partir d'une excitation infrarouge des nanoparticules apporte trois avantages : une faible auto-fluorescence de fond, une plus forte pénétration des tissus irradiés et une grande photostabilité <sup>[324, 328]</sup>.

### • Les nanoparticules à base de silice

Un chapitre de livre a été entièrement dédié aux nanoparticules à base de silice, et inclus en fin de ce chapitre d'introduction.

L'étude des nanosphères de silice et le contrôle de leur croissance (dans des dimensions de l'ordre du micromètre en milieu monophasique) a été réalisée pour la première fois dans les années 1960 par Stöber, Fink et Bohn. Cette étude a porté sur la variation de dispersion de taille des nanoparticules de silice ainsi que sur la vitesse de réaction de tétraalkyle silicate (Si-R<sub>4</sub>) en présence de différents alcools et/ou d'eau en condition basique (ammoniaque). Le méthanol est le solvant qui permet d'obtenir les plus petites nanoparticules et que la catalyse basique est une condition nécessaire à l'obtention de nanoparticules sphériques <sup>[329]</sup>. Une technique de synthèse apparue dans les années 1990 et couramment utilisée est la micro-émulsion inverse aussi appelée micro-émulsion eau-huile. Cette

technique consiste à agiter un mélange constitué de deux liquides non miscibles additionné d'un tensio-actif, ce qui permet d'obtenir de petites gouttelettes de phase aqueuse de tailles contrôlables en suspension dans l'huile. Il est alors possible de faire croître des nano-objets à l'intérieur de ces micelles inverses par hydrolyse-condensation d'alkoxysilanes <sup>[330]</sup>. D'un point de vue de leur synthèse, ces nanoparticules présentent l'avantage de pouvoir être façonnées afin d'obtenir une taille et une forme choisies, avec un volume de pore et une surface spécifique contrôlés <sup>[263, 272]</sup>. Elles présentent également l'avantage d'être chimiquement inertes et de posséder une matrice poreuse qui ne se modifie pas en fonction des variations de pH <sup>[263]</sup>. Lorsqu'elles sont obtenues par la synthèse de micro-émulsion directe (eau dans huile), le volume important de leurs pores (0,6 à 1,0 mL.g<sup>-1</sup>), leur grande dimension (2 à 30 nm) ainsi que leur surface spécifique élevée (600-1000 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) permet de charger ces nano-objets mésoporeux avec une quantité non négligeable de molécules actives <sup>[229, 272]</sup>. Il est également possible de fonctionnaliser leur surface afin de contourner les problèmes d'interactions biologiques non désirées, de faciliter la biodisponibilité ou encore d'augmenter l'internalisation au niveau des cellules afin d'accroître l'efficacité thérapeutique. Ceci s'obtient en modifiant les conditions de synthèse et/ou en faisant varier les réactifs utilisés lors de leur élaboration. Il est ainsi possible d'utiliser, pendant la synthèse ou dans une deuxième étape, des mélanges d'alkoxysilanes comportant différents groupements tels que : -R-NH<sub>2</sub>, -R-COOH, -R-SH <sup>[272, 331]</sup>.

Ces nano-objets sont obtenus par la réaction d'hydrolyse-condensation de précurseurs silanés en présence d'un catalyseur (acide ou base) et d'une molécule comportant un groupement hydroxyle (-OH). La catalyse acide favorise la formation de polymères de type linéaires alors que la catalyse basique conduit à la formation de polymères de type branchés. Silva et Airoldi <sup>[175]</sup> ont ainsi montré que la catalyse basique (Figure 107, Figure 108) permet d'obtenir des silices avec des tailles de pores plus faibles comparées à celles obtenues avec la catalyse acide (Figure 109, Figure 110).

Ces nanoparticules présentent une large gamme d'applications. Elles peuvent être utilisées pour la fabrication de détergents, la conception d'isolants thermiques, comme adsorbants ou anti-agglomérants. Elles peuvent également servir de support pour la catalyse <sup>[331]</sup>. De plus, du fait de la polyvalence au niveau de leur fonctionnalisation, il est possible de les utiliser pour l'imagerie de fluorescence et/ou pour l'IRM, pour la thérapie dans le cadre du transport de molécules actives ou encore pour la PDT <sup>[229]</sup>. Nous nous concentrerons, ici, sur le domaine concernant les nanoparticules de silice pour les applications médicales. Ces nano-objets sont de deux types : les nanoparticules de silice pure et les nanoparticules de type cœur-coquille (*core-shell*).

Une autre technique, appelée micro-émulsion inverse (huile dans eau) permet d'obtenir des silices microporeuses.

### *Les enrobages de silice*

Ils présentent plusieurs avantages comparés aux enrobages de polymères organiques. La silice obtenue est beaucoup plus stable que les polymères et elle n'est pas vulnérable aux attaques bactériennes. Contrairement aux polymères, elle ne se déforme pas et sa polarité ne change pas en fonction du pH. Elle peut également être modifiée au niveau de sa surface par une multitude de groupements fonctionnels en utilisant la réactivité chimique des silanes et des réactifs organosilanés. De plus, elle joue un rôle important dans la protection, la photostabilité et la stabilité chimique de la nanoparticule (fluorescente) enrobée <sup>[117]</sup>.

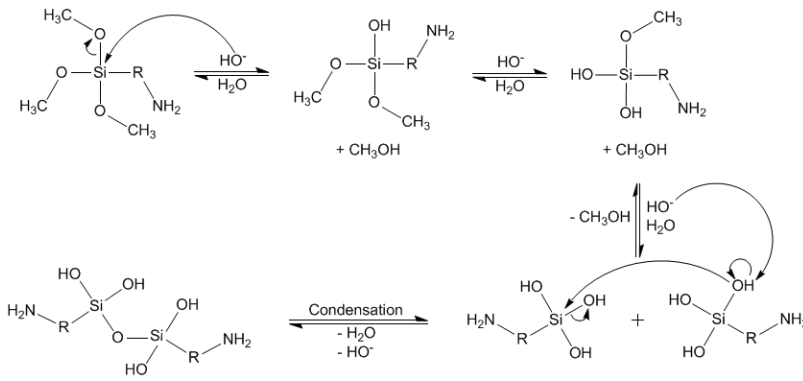


Figure 107 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse-condensation de précurseurs de silice en catalyse basique, d'après la référence [175].

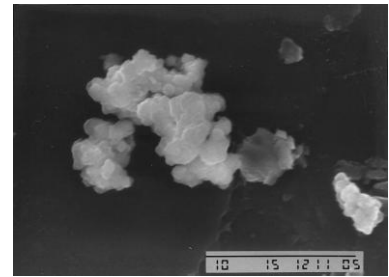


Figure 108 : Photographie TEM des nanoparticules de silice obtenues par catalyse basique, d'après la référence [175].

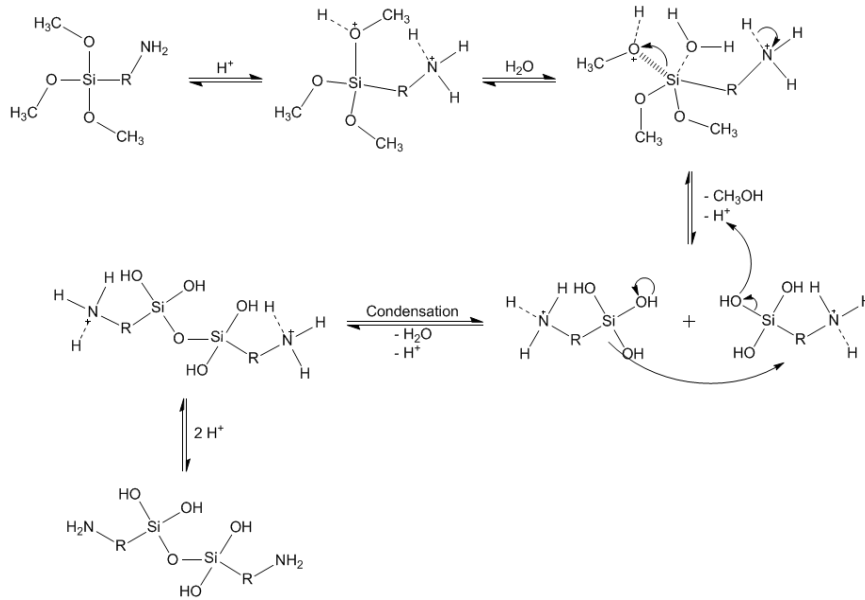


Figure 109 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse-condensation de précurseurs de silice en catalyse acide, d'après la référence [175].

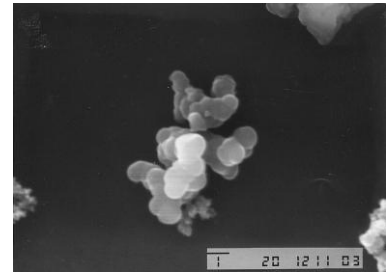


Figure 110 : Photographie TEM des nanoparticules de silice obtenues par catalyse acide, d'après la référence [175].

## Non Polymeric Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications: Recent Developments

R. Chouikrat<sup>1,3</sup>, A. Seve<sup>1,2</sup>, R. Vanderesse<sup>#,2</sup>, H. Benachour<sup>4</sup>, M. Barberi-Heyob<sup>#,4</sup>, S. Richeter<sup>5</sup>, L. Raehm<sup>5</sup>, J.-O. Durand<sup>5</sup>, M. Verelst<sup>3</sup> and C. Frochot<sup>\*,#,1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR 3349, Nancy-Université, 1, rue Grandville, BP451, 54001 Nancy Cedex, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, UMR CNRS-INPL 7568, Nancy-Université, 1 rue Grandville, BP451, 54001 Nancy Cedex, France

<sup>3</sup>Centre d'Elaboration de Matériaux et d'Etudes Structurales, Université de Toulouse - UPS, 29 rue Jeanne Marvig, BP 94347, 31055 Toulouse, Cedex 4, France

<sup>4</sup>Centre de Recherche en Automatique de Nancy, UMR 7039, Nancy-Université, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Brabois, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

<sup>5</sup>Institut Charles Gerhardt Montpellier, UMR 5253 CNRS-UM2-ENSCM-UM1, Equipe Chimie Moléculaire et Organisation du Solide, CC1701 Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

**Abstract:** Photodynamic therapy has emerged as an alternative to chemotherapy and radiotherapy for cancer treatment. Nanoparticles have recently been proposed as effective carriers for photosensitizers. Depending on their chemical composition, these can be used for diagnosis and therapy due to the selective accumulation of the photosensitizer in cancer cells *in vitro* or in tumors *in vivo*. Multifunctional nanoplatforms combining several applications within the same nano-object emerge as potential important theranostic tools. This review, based on the chemical nature of the nanoparticles will discuss recent advances in the area of non polymeric nanoparticles for photodynamic therapy applications.

**Keywords:** Nanoparticle, photosensitizer, photodynamic therapy, reactive oxygen species, nanomedicine.

### INTRODUCTION

Over the last few years, photodynamic therapy (PDT) has emerged as an alternative to chemotherapy and radiotherapy for the treatment of various diseases including cancer [1, 2]. It involves the use of light, photosensitizers (PS) and oxygen. The excitation of photosensitizers (PSs) with light of an appropriate wavelength leads to energy or electron transfer to neighboring oxygen or substrate molecules [3]. Reactive Oxygen Species (ROS) and singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) which are commonly accepted to be the main cytotoxic species are formed and lead to the destruction of cancer cells by both apoptosis and necrosis. The efficacy of PDT depends on the photosensitizer's ability to produce ROS and <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, oxygen availability [4], light dose and photosensitizer concentration in the treated area.

PDT is an alternative treatment approach to cancer treatment. However, the clinical efficiency of this technique is often limited by the difficulty in administering mostly hydrophobic photosensitizers intravenously, low photodynamic yield of the hydrophobic photosensitizers due to their aggregation in solution, inadequate pharmacokinetic due to the low water solubility of the majority of the photosensitizers used, and the low selectivity towards malignant tissues.

To improve the accumulation of photosensitizers into the desired area, anticancer therapy tends towards creating hybrid molecules composed of a photo-activatable principle associated with a recognition module. Conjugation of a photosensitizer with targeting modules such as sugars [5] or folic acid [6], which have a particular affinity for the cognate receptors present in abnormally large numbers on the tumor surface, leads to a significant and selective increase in cellular incorporation, and therefore of photodynamic activity. Even if a great deal of effort has been made

in developing third generation PS with a covalently linked vector to target receptors over-expressed in cancer cells, very few have been evaluated for clinical applications mainly because their *in vivo* selectivity was not high enough [7].

New improvements concern the use of nanoparticles that can work as carrier for anti-cancer agent delivery. An indication of the level of interest in nanoparticles for therapeutic applications is illustrated by the number of reviews that have been written in the last two years on nanoparticles and citing PDT in control of oral biofilm [8] antimicrobial PDT [9] and in combination with other anti-tumor modalities [10]. They do indeed have many advantages such as good colloidal stability, effective protection of encapsulated drug against enzymes and hydrolysis, surface tailorability and multifunctionality, and relatively easy to prepare. More importantly, thanks to their size, nanoparticles allow the selective accumulation of the PS in cancer cells due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect of tumor tissues [11]. In 2010, an overview of the different methods for the synthesis of silica-based nanoparticles, from the pioneering works to the latest achievements, was provided by our team [12]. In a book chapter, we also described the main nanoparticles possessing a three dimensional rigid matrix for PDT applications [13]. Since then, two reviews and a book chapter have been devoted to the use of nanoplatforms to improve PDT applications [14-16].

In this review we will focus on the latest works related to nanoparticles possessing a three dimensional rigid matrix except quantum dots. Liposomes, micelles [17-21], low-density lipoprotein [22], polymer-based [23-29], lipid nanoparticles [30], HAS [31-34], hydrogel or nanogel [35, 36], chitosan [37-40], dendrimers [41] and pluronic [42] will not be described here.

### NANOPARTICULAR SYSTEM FOR PDT

The development of nanoparticles-based photosensitizers can overcome most of the shortcomings of classic photosensitizers such as liver accumulation [43-45]. The different types of nanoparticles designed for PDT applications are shown in Fig. (1).

\*Address correspondence to this author at the Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR 3349, Nancy-Université, 1, rue Grandville, BP451, 54001 Nancy Cedex, France; Tel: 33 (3) 83 17 51 15; Fax: 33 (3) 83 32 29 75; E-mail: celine.frochot@ensic.inpl-nancy.fr

<sup>#</sup>GDR 3049 "Médicaments Photoactivables - Photochimiothérapie (PHOTOMED)"



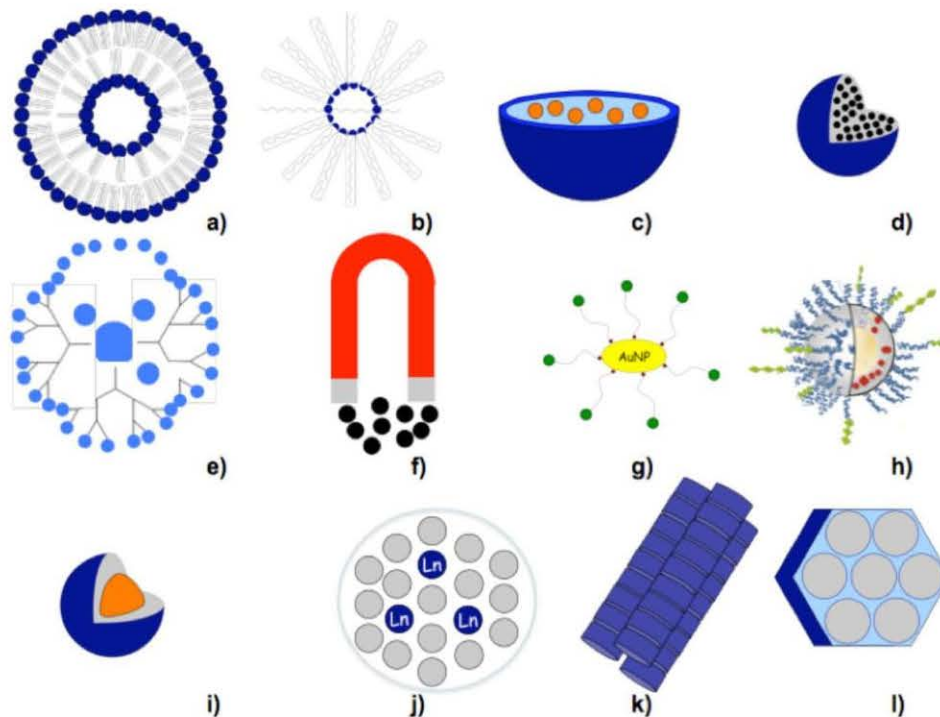


Fig. (1). Main nanodrugs used for cancer treatment and diagnosis.

#### Biodegradable nanoparticles

a) Liposomes – Polymeric NPs; b) polymeric, c) capsules, d) nanospheres – e) dendrimer.

#### Non-biodegradable nanoparticles carriers

\*passive nanoparticles: f) magnetic, g) gold, h) multifunctional silica, k) nanotubes, l) zeolite

\*active nanoparticles: i) quantum dot, j) up-converting NPs.

Their composition characteristics for drug delivery in cancer are: [43]

- Polymeric nanoparticles that can be made biodegradable by an appropriate choice of composition and structure.
- Their surfaces can be modified with functional groups possessing a diverse array of chemical or biochemical properties. The nanoparticles can be tailored with compositions so that they do not undergo enzymatic degradation and thus effectively protect the encapsulated probes or drugs.
- Due to their sub-cellular and nanometer size, they can penetrate deep into tissues through fine capillaries and pass through the *fenestrae* into the epithelial lining the blood vessels.
- Depending on their chemical composition, they may be:
  - resistant to microbial attack (for example silica nanoparticles))
  - immunogenic, not eliciting any immune response when introduced in the body's circulatory system, which often leads to severe consequences by shutting off or clogging up the circulatory system (for example small nanoparticles with hydrophilic surfactant)
  - produced in an optically transparent form. Therefore, light activation and optical probing can readily be accomplished.

They can have higher extinction coefficients than organic dyes.

- Nanoparticles are more photostable than organic dyes for *in vivo* applications.
- Polymeric nanoparticles provide three different structural platforms for diagnosis and therapy namely:
  - i. an interior volume in which various probes and therapeutic agents can be encapsulated;
  - ii a surface which can be functionalized to attach targeting groups to carry the nanoparticles to cells or biological sites expressing appropriate receptors. In addition, the surface can bind to specific biological molecules for intracellular delivery (such as DNA in gene therapy). The surface can also be functionalized to introduce a hydrophilic (polar), hydrophobic (non-polar) or amphiphilic character to enable dispersibility in a variety of fluid media; and
  - iii pores in the nanoparticles, which can be tailored to be of specific sizes to allow selective intake or release of biologically active molecules or to activate therapeutic agents. Thus the area of mesoporous polymers with controlled porosity is of intense current activity and interest.

- They can be used for different therapies (e.g. radiotherapy, hyperthermia).

A possible classification of nanoparticles used for PDT relies on their chemical composition. In this review, we will only discuss the most recent developments nanoparticles possessing a three dimensional rigid matrix in (references in bold in Table 1) which were not described in our previous reviews [12, 44] or chapter book [13]. Table 1 shows an overview of all the non polymeric nanoparticles based PDT systems except quantum dots with the type of nanoparticle, their size, the photosensitizer that has been encapsulated (E) or covalently linked and *in vitro* or *in vivo* experiments.

### GOLD NANOPARTICLES

Among all the metal nanoparticles, gold NPs (AuNPs) are receiving the greatest attention mainly due to a combination of unique properties that lend themselves to multiple applications such as labeling, delivery, heating and sensing. Moreover, due to localized surface plasmon resonances, it has been recently demonstrated that the field enhancement of the incident light around gold nanoparticles could be used to increase the excitation efficacy of the photosensitizer [133]. Reum *et al.* worked on the functionalization of gold surface nanoparticles using a layer by layer technique (14.5 nm diameter) [58, 59]. Citrate-stabilized gold nanoparticles negatively charged were encapsulated with a poly(allylamine hydrochloride) (PAH) layer. A *m*THPP-polystyrene sulfonate complex (PSS/*m*THPP) was prepared and increased the solubility of *m*THPP in water.  $\pi$ - $\pi$  interactions and hydrogen bonds were involved in the immobilization of *m*THPP as shown by docking studies. The negatively charged complex was then adsorbed on the surface of the PAH-gold nanoparticles. Five layers, three PAH and two PSS/*m*THPP were used to embed the gold nanoparticles and 1035 *m*THPP molecules by gold nanoparticle were encapsulated. Unfortunately, no PDT experiments were performed.

The team of D. Russell was the first to develop in 2002 phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles as potential delivery vehicle (Table 1). The same team studied the *in vivo* efficacy of the C11Pc phthalocyanine derivative and the corresponding AuNP-C11Pc conjugates (2-4 nm) for the PDT of amelanotic melanoma (B78H1 cells) sub-cutaneously transplanted on mice [54]. Interestingly, the AuNP-C11Pc conjugates were found to target cancer tissues more selectively and to induce a more extensive PDT response compared to the free C11Pc photosensitizer. Moreover, longer blood circulation and greater accumulation in most organs were observed with AuNP-C11Pc conjugates. Vascular damage observed by electron microscopy suggested that the PDT efficacy can be explained by an anti-angiogenic action promoted by the AuNP-C11Pc conjugates. More recently, they described the vectorization of AuNP-C11Pc conjugates for PDT of breast cancer cell lines by functionalizing the AuNPs surface with a heterobifunctional polyethylene glycol HS-PEG-COOH 3000 *via* S-Au linkage and by attaching anti-HER2 monoclonal antibodies to the PEG chain *via* an amide linkage [57]. Anti-HER2 antibodies are able to specifically target HER2 epidermal growth factor cell surface receptors overexpressed on the surface of breast cancer cells like SK-BR-3. Thus, anti-HER2 antibodies were found to enhance the selective targeting of this type of breast cancer cell and through the efficacy of the 4-component "antibody-C11Pc-PEG-AuNPs" conjugates for PDT applications.

In another study, Zaruba *et al.* synthesized and immobilized two porphyrin-brucine quaternary ammonium salts on gold nanoparticles (14.7 nm diameter) [55]. The porphyrin-brucine systems were incubated with mouse mammary carcinoma cell line 4T1. Confocal microscopy experiments demonstrated the localization of the porphyrin derivatives in the lysosomes. *In vitro*

PDT experiments showed that porphyrin-brucine alone were more effective for cancer cell death than when immobilized on gold nanoparticles. However *in vivo* experiments revealed a higher PDT efficacy of the porphyrin system bonded on the gold nanoparticles due to the interactions of plasma proteins with the nanoparticles, and an enhanced EPR effect, resulting in the potent accumulation of the nanoparticles in tumors.

PEG molecules grafted on the surface of AuNPs prevent their aggregation and non-specific binding. Cheng *et al.* used these ligands to encapsulate silicon phthalocyanine 4 (*Pc4*) photosensitizer through Van der Waals interactions. Drug release experiments showed that *Pc4* molecules were released within the first two hours, and that tumor cells accumulated the drug [51]. Moreover, *in vivo* experiments showed an enhanced accumulation of *Pc4* molecules in tumor sites of cancer-bearing mice. The AuNP-*Pc4* conjugates dramatically decreased the drug delivery time necessary for PDT from two days to two hours compared to free *Pc4* molecules. The efficacy of PDT can be deduced by observing a decrease of the tumor volume which became necrotic. Cheng *et al.* also showed that drug delivery into HeLa cancer cells, and thus PDT efficiency were strongly affected by the nature of the bond between the photosensitizer and the AuNPs [134]. Non-covalent interactions between AuNPs and *Pc4* molecules were essential for effective drug release and a significant uptake of the photosensitizer into the cells. *In vivo* biodistribution of *Pc4* in rat glioma (9 L) cancer bearing-mice confirmed this fact and showed a rapid accumulation of the photoactive drug within the tumor tissue [56]. Moreover, this study allowed the authors to determine a PDT time window from 1 to 6 hours after intravenous injection. The possible mechanism involves Au-NP-*Pc4* accumulation in tumors, the release of the drug from the nanoparticle and its transport into the cytoplasm of tumor cells by low density lipoproteins and other hydrophobic molecules. The 7-days test period also showed rapid drug and AuNPs excretion by renal clearance and the hepatobiliary system.

### SILICA NANOPARTICLES

Among the variety of nanoparticles, silica-based nanomaterials have very recently emerged as promising vectors for PDT applications. Silica nanoparticles are indeed chemically inert and the silica matrix porosity is not susceptible to swell or change with a varying pH. A variety of precursors and methods are available for their synthesis allowing flexibility and thus meaning numerous PDT drugs can be encapsulated. Furthermore, particles size, shape, porosity and mono-dispersibility can be easily controlled during their preparation [12]. Moreover silica nanoparticles are especially suitable for PDT since they do not release the photosensitizer but allow O<sub>2</sub> and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> to diffuse in and out through the shell of silica nanovehicles, reducing the risk of toxicity and vascular clogging caused by free PSs aggregate into clusters in blood.

#### Non Covalent Encapsulation of PS In Silica Nanoparticles

Following the pioneering work of Prasad and Kopelman groups [60, 61], several researchers have tried to encapsulate PS inside silica nanoparticles (Table 1). In 2003, the precursor work of Kopelman led to the encapsulation of *meta*-tetra(hydroxyphenyl) chlorin or Foscan® into silica nanoparticles [60]. The same group published the encapsulation of methylene blue [62] or more recently polyacrylamide-based (PAA) nanoparticles were engineered for the intracellular delivery of active agents. Qin *et al.* encapsulated two different methylene-blue derivatives PS in PAA nanoparticles *via* covalent linking, allowing the protection of the methylene derivatives from enzymes in the biological environment. After attachment of F3 peptide groups for targeting, each type of nanoparticle was tested *in vitro* for PDT with MDA-MB-435 tumor



Table 1. Three Dimensional Rigid Matrix Nanoparticles (Except Quantum Dots) for PDT Applications

Type of nanoparticles	Size (nm)	PS	C/E	Phototoxicity test. <i>In vitro</i> model	Ref.(s)
Gold	2-4	ZnPc	C	-	[46]
	2-4	ZnPc	C	human malignant cervical cells (Hela)	[47]
	8-25	cholinium-Purpurin-18	C	Human lung carcinoma cell, A596	[48]
	30	ALA	E	human neonatal dermal fibroblast and human fibrosarcoma (HT 1080)	[49]
	5	Pc4	C/E	human malignant cervical cells (Hela)	[50, 51]
	L: 35 W: 9	Toluidine blue O	C	bacteria	[52]
	L: 35 W: 9	Indocyanine green	C	human lung carcinoma malignant cell line (A549)	[53]
	2-4	C11Pc	C	C57 mice-amelanotic melanoma	[54]
	15	Porphyrin-brucine	E	PE/CA-PJ34 squamous cell carcinoma cells line	[55]
	5	Pc4	C/E	Rat glioma cancer cells (9 L) (overexpressing EGFR +TFR)	[56]
	4	C11Pc	C	breast cancer cell lines (SK-BR-3 - MDA-MB-231)	[57]
15	mTHPP	E	-	[58, 59]	
Silica	180	mTHPC	E	-	[60]
	30	HPPH	E	UCI-107, human epithelial ovarian carcinoma, Hela	[61]
	160	Methylene blue	E	C6 (rat glioma)	[62]
	10	fullerene	C	-	[63]
	30	HPPH+BDSA	E	human malignant cervical cells (Hela)	[64]
	25	HPPH	E	-	[65]
	20	IP	C	colon 26	[66]
	130	Hypocrellin A	E	human malignant cervical cells (Hela)	[67, 68]
	55-90	PpIX	C	-	[69]
	25	PPIX	E	human malignant cervical cells (Hela)	[70]
	30	mTHPC	E	human oesophageal cancer cells KYSE 510	[71]
	25-30	Pc4	E	melanoma cells (A-375 and B16-F10)	[72]
	60	Two-photon absorption PS	E	macrophages	[73]
	105	Methylene blue	E	human malignant cervical cells (Hela) + balb/c nude mice	[74]
	110	PpIX	C	human malignant cervical cells (Hela)	[75]
	70-100	PdTPP	C	breast cancer cell line (MDA-MB-231 ), glioblastoma cells (U87-MG)	[76]
	160	Anionic porphyrin	C	MDA-MB-231 breast cancer cell line	[77]
	57	hematoporphyrin	C	HO-8910 PMcells	[78]
	10, 25, 60	PpIX	E	colon cancer cell line (HCT 116) and HT29, A431, LLBC37, MDA-MB-231	[79]
	110	Hypocrellin A	E	human malignant cervical cells (Hela)	[21]
	100	Hypocrellin B	E	breast cancer cell line (MCF-7 )	[80]
	50-80	Rose bengal	C	Staphylococcus aureus (MRSA) and Staphylococcus epidermis.	[81]
	78-150	porphyrin	C	breast cancer cell line (MDA-MB-231)	[82]
50	TPP	E	-	[83]	
10-200	PpIX	E	HCT 116 (colon cancer line)	[84]	
8-14	TPC	C	MDA-MB-231 breast cancer cell line	[85]	
Silica NaYF <sub>4</sub> /Yb <sup>3+</sup> , Er <sup>3+</sup>	60 - 120	merocyanin	E	breast cancer cells lines (MCF-7/AZ)	[86]
	30	HPPH-BDSA	E	human malignant cervical cells (Hela)	[65]
	35-60	ZnPc	E	bladder cancer cell lines (MB49)	[81, 87]
	30	Chlorin e6 TCPP	E	-	[88]
	30	Chlorin e6	C	Hela cells 4T1 murine	[89]

(Table 1). Contd.....

Type of nanoparticles	Size (nm)	PS	C/E	Phototoxicity test. <i>In vitro</i> model	Ref.(s)
silicon	3-4	-	-	mouse fibroblasts	[90]
	2.4	-	-	-	[91]
Carbon nanotube	-	Chlorin e6	E	-	[92]
	-	Bodipy-based PS	E	-	[93]
	-	phenosafranine and Nile Blue	E	BHK-21(mouse fibroblast)	[94]
TiO <sub>2</sub>	300	-	-	HeLa T-24 human bladder cells	[95, 96]
	-	-	-	human LoVo cancer	[97]
	-	Chlorin e6	E	human malignant cervical cells (Hela)	[98, 99]
	-	Chlorin e6	E	cancer murine thymic lymphoma (EL-4)	[100]
	150	-	-	MCF-7 breast cancer cell line	[101, 102]
	1	ZnPc	E	HepG2, THP-1, HDFs cells, Leishmania parasites	[103, 104]
	100-175	-	C	HepG2 cancer cells	[105]
	10	-	-	human malignant cervical cells (Hela)	[106]
	40	-	-	U251 human glioblastoma cell line	[107, 108]
ZnO	6	-	-	C32 cells	[109]
	5	meso-tetra (o-amino phenyl) porphyrin	C	human carcinoma NIH:OVCAR-3 cells	[110]
	3-4	TPP, H <sub>2</sub> TPP(NH <sub>2</sub> ), H <sub>2</sub> TPP(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> and ZnTPP(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	C	-	[111, 112]
	4	daunorubicin	-	SMMC 7721 cells	[83, 113, 114]
Mg-Al hydroxides	4	PpIX	E	-	[111, 115]
Ca-phosphate	100	mTHPP Methylene Blue	E	HT29 colon cancer cells, HIG-82 synoviocytes. J774A.1 macrophages	[116]
zeolite	50	tetra-tert-butyl-substituted Si <sup>IV</sup> , phthalocyanine dihydroxyle	C	E. Coli and N. Gonorrhoeae bacteria	[117]
Iron oxide + PAA or Silica	30-60	Photofrin <sup>®</sup>	E	MDA-MB-435 human breast cancer	[118]
	30-60	Photofrin <sup>®</sup>	E	9L (rat glioma)	[119]
	40	Photofrin <sup>®</sup>	E	MDA-MB-435 human breast cancer + 9L (rat glioma)	[120]
	30	Methylene blue	E	-	[121]
	55	Ir(III) complex	C	human malignant cervical cells (Hela)	[122]
	33	TPHC	C	RAW 264.7 and U937 cells	[123]
	50	TPHC	C	apolipoprotein E deficient (apoE <sup>-/-</sup> ) mice	[124]
	20-30	Purpurin-18	E	-	[125]
	20-30	PHPP	E	SW480 colon carcinoma cells	[126]
	25	HPPH	E	RIF-1 tumor cells	[127]
	30-50	PHPP	E	-	[125]
50	ZnPc	C	human Hepatoma cells QGY-7703, HeLa cells	[128]	
Polyacrylamide	13-18	MB derivatives	C	human breast cancer cells (MDA-MB-435)	[129]
Co/Fe/Mo	8	Chlorophyllin	E	gingival fibroblasts cells	[130]
Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	20	Ce6	C	MGC803 cells	[131]
nano-BMPF	136	fullerene	E	-	[132]

Size: hydrodynamic diameter in nm; PS: photosensitizer; C/E: C covalently coupled, E encapsulated; BTB: Bromothymol Blue; BCP: Bromocresol Purple; BDSA: 9,10-bis [4'-(4'-Aminostyryl)styryl]-anthracene; BMPF: bismethanophosphonate fullerene; C11Pc: Zn(II)-phthalocyanine disulphide; HPPH: 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl-pyrropheophorbide; IP: iodobenzylpyropheophorbide; Mo-Chl: molybdenum chlorophyllin; MSN: mesoporous silica nanoparticles; meso-tetra(o-aminophenyl) porphyrin; mTHPC: meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin; mTHPP: meso-tetrahydroxyphenyl porphyrin; PC: phthalocyaninedihydroxyle; Pc4: silicon phthalocyanine 4; Pc19: Silicon phthalocyanine 219; PHPP: 2,7,12,18-tetramethyl-3,8-di(1-propoxyethyl)-13,17-bis-(3-hydroxypropyl)porphyrin; PpIX: Protoporphylin IX; PdTPP: Pd-meso-tetra(4-carboxyphenyl) porphyrin; PHPP: 2,7,12,18-tetramethyl-3,8-di(1-propoxyethyl)-13,17-bis-(3-hydroxypropyl)porphyrin; TPC: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin; TCPP: meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphyrin; TPHC: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-2,3-dihydrochlorin; TPP: meso-tetraphenyl porphyrin; ZnPc: Zinc(II) phthalocyanine; "-": not specified.

cells. Both kinds of nanoparticle resulted in effective tumor cell killing and did not cause dark toxicity [129].

Thienot *et al.* also described in 2010 one pot synthesis of hybrid versatile nanocarrier exhibiting efficient stability in biological environment [84]. These nanoparticles are made of PpIX silica-based nanocarriers with bilayer coating of triethoxyvinylsilane. One of the advantages of this synthetic strategy is that these nanocarriers may be tuned within the nanometer range from 10 nm to 200 nm by control of the temperature, reagents quantities and co-surfactant agent. The PpIX silica-based nanocarriers show efficient accumulation within tumors. The generation of  $^1\text{O}_2$  was determined chemically by bleaching of DPBF.

Two-photon absorption (TPA)-induced excitation of photosensitizers is a promising approach for increasing light penetration [135] as well as up-conversion, in which excitation light at a longer wavelength produces emission at a shorter wavelength. This concept of photon up-converting nanoparticles (PUNPs) for PDT was first published by Zhang *et al.* [86].  $\text{NaYF}_4/\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$  nanoparticles have been used as PUNP and coated with a PS (Merocyanine 540)-encapsulating porous thin layer of silica. Recently, the team of Zhang *et al.* described sodium yttrium fluoride up-conversion nanoparticles as a carrier for zinc(II)-phthalocyanine. Mesoporous silica was coated onto  $\text{NaYF}_4$  nanocrystals to form a core-shell structure loaded with  $\text{ZnPc}$ . Upon irradiation at 980 nm, they proved that the PUNP activated the PS and showed a strong photodynamic effect on MB49 cells [81, 87]. Wang and his team published pegylated  $\text{NaYF}_4$  PUNP loaded with a chemotherapy molecule doxorubicin physically adsorbed and targeted by folic acid. To test whether their drug loading could be applied to PDT, they incubated the PUNP with Ce6 and TCPP and showed a loading capacity of 8.6 % (w/w) and 7.3% (w/w) respectively [89]. More recently, they were the first team to demonstrate *in vivo* NIR-induced PDT based on PUNPs in animal experiments [89]. In this work, they loaded ce6 onto  $\text{NaYF}_4$  based PUNP functionalized by polyethyleneglycol. Their main conclusion is that although  $^1\text{O}_2$  formation is more effective using direct excitation of Ce<sub>6</sub> at 660 nm than excitation at 980 nm, the PUNP offers terrifically improved tissue penetration depth and could be preferable for the treatment of large or internal tumors.

#### Covalent Encapsulation of PS In Silica Nanoparticles

When physically entrapped inside the silica network, the PS may be prematurely released from the carrier which can lead to a reduced efficiency of treatment and to side-effects. Covalent coupling of the PS inside or at the surface of the nanoparticles is expected to overcome these drawbacks. Moreover, further progress in the field of silica nanoparticles for PDT was achieved when multifunctional particles were functionalized by a biomolecule able to specifically target cancer cells. Active targeting represents an obvious field for improvement for PDT. Until now, most of the efforts in the development of tumor targeting-photosensitizers focused on the targeting of markers over-expressed by tumor cells themselves even if anti-vascular strategies are becoming more and more important [7, 43, 136]. For reviews see [137, 138]. Our team [82] described the synthesis of Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles (MSN), which covalently incorporate original water-soluble porphyrins. PDT was performed on MDA-MB-231 breast cancer cells and all the nanoparticles showed a significant cell death after irradiation. The PDT efficiency of the nanoparticles was not only correlated with the  $^1\text{O}_2$  quantum yield but also by cellular uptake and subcellular localization of the nanoparticles in the organelles. The most effective pathway consists of functionalizing the surface of the nanoparticles with  $\alpha$ -mannose in order to promote an active endocytosis of the nanoparticles by cancer cells. We showed that the quantity of mannose on the surface should be carefully adjusted as too high an amount of mannose impairs the

phototoxicity of the nanoparticles. The data demonstrated that the optimization of the different parameters of these multifunctional nanoparticles is a relevant prerequisite before their *in vivo* PDT application.

More recently [85], we conjugated a second generation photosensitizer, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC) and around four ATWLPPR peptide units to a hybrid gadolinium oxide nanoparticle that could be useful for magnetic resonance imaging (MRI) and PDT. Hydrodynamic diameter of the nanoparticles was comprised between 8 and 14 nm whereas the  $\text{Gd}_2\text{O}_3$  core had a hydrodynamic diameter of 3.8 nm. Nanoparticles conferred photosensitivity on MDA-MB-231 breast cancer cells over-expressing neuropilin-1, providing evidence that TPC-grafted within the nanoparticle matrix can be photoactivated to yield photocytotoxic effects *in vitro*. For the first time, molecular affinity was tested for peptide-functionalized nanoparticles, and the presence of four peptides ligand per nanoparticle was seemingly found to lead to a positive cooperativity in binding of ATWLPPR to NRP-1 protein.

#### CARBON NANOPLATFORMS

Single (SWNTs) or multiwalled carbon nanotubes (MWNTs) can be used as delivery agents for PDT photosensitizers. Carbon nanotubes present several advantages. It has been shown that they are internalized by mammalian cells [139] through endocytosis [140] even if other mechanisms can occur [141], they are excreted from the body rapidly and present no significant cytotoxicity [142], they can be modified chemically [143, 144] but non covalent associations are also possible. Since the publication of our book chapter [13] no new work has been devoted to carbon nanotubes although one study covers the use of fullerene [132]. Indeed, fullerene and its derivatives have been extensively studied in the biomedical field. Their biological activities towards various cell types have been reported, and previous results have highlighted their potential uses as photosensitizers in photodynamic therapy of tumor and photoinactivation of bacteria and viruses, antioxidative/cytoprotective reagents and carriers for drug delivery. In a recent publication, Yang *et al.* [132] described the effects of a BMPF (bismethanophosphonate fullerene) on matrix-related gene expression. Mediation of BMPF into water by DMSO leads to formation of an aqueous suspension of nanoparticles with an average size of 136.3 nm (nano-BMPF). These nanoparticles could induce a down-regulation of gene expression of matrix proteins aggrecan, type I and type II collagen and an up-regulation of gene expression of matrix metalloproteinase 3. IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist), but not IL-1 receptor 1, was transcriptionally inhibited by nano-BMPF. This data indicated a disc degeneration-inducing activity of nano-BMPF, raising concerns regarding possible adverse effects, while a fullerene-based treatment of disc diseases is employed.

#### TiO<sub>2</sub>/ZNO NANOPARTICLES

##### TiO<sub>2</sub> Nanoparticles

The application of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in life science is attracting more and more attention since the first report of photocatalytic disinfection by Matsunaga *et al.* in 1985 [145]. In recent years, TiO<sub>2</sub> nanoparticles were used in the field of phototherapy of malignant cells, and have been viewed as the potential photosensitizing agents for PDT due to their unique phototoxic effect upon the irradiation [95, 146-151]. In 2010, Tessy Lopez group investigated the possible synergy of zinc phthalocyanines ( $\text{ZnPc}$ ), supported on TiO<sub>2</sub> nanoparticles and probed their *in vitro* photoactivity using visible light, on cancer cells and Leishmania parasites [103, 104]. They studied the photosensitizing effect of  $\text{ZnPc}$ , nano-TiO<sub>2</sub>, and  $\text{ZnPc}$ -TiO<sub>2</sub>



conjugate, against a panel of tumor and normal mammalian cells and on promastigote forms of *Leishmania* parasites. As was expected, nano-TiO<sub>2</sub> alone under visible light irradiation was not phototoxic for the cells; in contrast, ZnPc treatment at the same condition was photoactive for all the studied cells and parasites. The composite ZnPc-TiO<sub>2</sub> was not found to be phototoxic for *L. Chagasi* or *L. Panamensis* promastigotes; however, it was active against tumor and nontumor mammalian cells but less than the pure ZnPc PS, which may be due to their lower internalization by the cells as compared to ZnPc. ZnPc-TiO<sub>2</sub> was internalized by the cells at a lower level than ZnPc. The localization of ZnPc-TiO<sub>2</sub> and ZnPc was observed in mitochondrial molecules. No fluorescence signal was observed in human-derived fibroblasts exposed to ZnPc-TiO<sub>2</sub>.

A newly developed therapy for cancer treatment is sonodynamic/photodynamic therapy (SDT/PDT). SDT is analogous to PDT except that drug activation is achieved through ultrasound instead of light. One of the main advantages is that, unlike visible light, ultrasound can be non invasive when applied from the exterior of the body and is capable of deep penetration. Yamaguchi's group developed a novel water-dispersed TiO<sub>2</sub> nanoparticle modified by PEG and demonstrated its photocatalytic anti-tumor effect on a glioma cell line [107]. In a more recent publication, the same group demonstrated that the sonodynamic cytotoxicity on U251 cells was strongly enhanced and was almost proportional to the duration of US exposure. In contrast, photodynamic cytotoxicity seemed to have a threshold UV energy dose [108]. In a similar way, Harada's group [109] and Ogino's group [105] studied the effect of ultrasound combined with a TiO<sub>2</sub> nanoparticle on respectively melanoma cells *in vitro* and *in vivo* and HepG2 cancer cells.

Liu *et al.* [106] proposed the Pt/TiO<sub>2</sub> nanocomposite for cancer-cell treatment because noble metal nanoparticles are supposed to enhance the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. To evaluate the cancer-cell killing effect of their Pt/TiO<sub>2</sub> nanocomposite, TiO<sub>2</sub> and Au/TiO<sub>2</sub> nanoparticles were also introduced. The prepared Pt/TiO<sub>2</sub> nanocomposite was characterized with transmission electron microscopy (TEM) and UV-vis absorption spectra. Results of cell treatment showed that Pt/TiO<sub>2</sub> nanocomposite, as extremely stable metal-semiconductor nanomaterial, could exhibit a very high photodynamic efficiency under a mild ultraviolet radiation. Pt/TiO<sub>2</sub> nanocomposite was found to be more effective in cancer cell treatment than TiO<sub>2</sub> and Au/TiO<sub>2</sub> nanoparticles. As a result, the Pt/TiO<sub>2</sub> nanocomposite may be presumed to have a promising application as a cancer-cell treatment.

### ZnO Nanoparticles

Because of its potential of non-toxicity, zinc oxide (ZnO) is also a candidate for the materials applicable for biomedicine [110, 152, 153]. Furthermore, among the PDT agents, ZnO is a material of particular interest due to its unique optical and electronic properties and has been widely used for device applications including transducers, phosphors and variators [154].

Although ZnO nanoparticles have been intensively used in the cosmetic industry for many years, they have only recently been explored as active cancer therapy drugs themselves [153]. ZnO nanomaterials are considered to be relatively biocompatible, with bulk ZnO being recognized as a GRAS (generally recognized as safe) substance by the FDA. ZnO has traditionally been used for photocatalytic oxidation of organic pollutants [153]. For nanoscale ZnO, large numbers of valence band holes and/or a conduction band are available to serve in redox reaction. The holes are powerful oxidants and can split water molecules into H<sup>+</sup> and OH<sup>-</sup>. The conduction band electrons are good reducers and react with dissolved oxygen molecules to generate superoxide radical anions

(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) which in turn react with H<sup>+</sup> to generate HO<sub>2</sub><sup>·</sup> radicals and others ROS.

Based on the photodynamic therapy concept, the photoactivation of ZnO nanoparticles is predicted to lead to greater levels of ROS release. Recent studies have described the ability of ZnO nanoparticles conjugated to porphyrin to synergistically induce cytotoxicity in ovarian cancer on exposure to UV-A light [114].

Energy transfer from the photoexcited ZnO particle to the conjugated porphyrin has been studied very recently by Hiromitsu [112] and results from a Förster mechanism. Similar studies have demonstrated that co-administration of ZnO nanoparticles and daunorubicin resulted in synergistic cytotoxic effects on leukemic cancer cells, which was enhanced further by UV irradiation [155]. In 2011 Zhang *et al.* [113] carried out the same kind of study by loading daunorubicin on ZnO nanorods in order to kill human hepatocarcinoma cells (SMMC-7721 cells). In this study ZnO nanorods appeared to be a good drug carrier and also an effective PDT inducer. However, there are still some drawbacks for ZnO nanostructures in the clinical use particularly the inability of UV light to penetrate deeper than 1 mm through skin.

### MAGNETIC NANOPARTICLES

Magnetic nanoparticles are used extensively in the field of biomagnetics for a broad range of applications, such as drug delivery [156-159], cell labelling and sorting [160], magnetic resonance imaging, sensing [161, 162] as well as therapeutic applications [163] such as an AC magnetic field-assisted cancer therapy, i.e. hyperthermia, PDT [164]. Luminescent magnetic particles are also attractive tools for life science applications such as multimodal imaging, analyte monitoring, nanotherapeutics, and combinations thereof. [165, 166].

In the field of PDT, Tedesco's group recently reported on the synthesis and characterization of molybdenum chlorophyllin (Mo-Chl) compounds associated in a complex with magnetic nanoparticles (citrate-coated cobalt ferrite), the latter prepared as a biocompatible magnetic fluid (MF). This complex material was developed for application as a synergic drug for cancer treatment using PDT and hyperthermia (HPT) [130]. Cellular viability was evaluated using gingival fibroblasts cells as a biological model. Studies performed with the complex Mo-Chl at different magnetic nanoparticle concentrations revealed a cellular viability of around 95% for the ideal magnetic material concentration of 1×10<sup>13</sup> particle.mL<sup>-1</sup>. This study shows that natural photosensitizers molecules Mo-Chl used in association with magnetic nanoparticles represent a promising generation of drugs developed to work synergistically in the treatment of neoplastic tissues using PDT and HPT, pointing towards its future application in clinical tests of neoplastic tissues.

More recently, Huang *et al.* designed and prepared photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles (~20 nm diameter) for gastric cancer imaging and therapy using MGC803 cells [131]. They found that the covalently incorporated Ce6 molecules retained their spectroscopic and functional properties for near infrared (NIR) fluorescence imaging and PDT, and the core magnetic nanoparticles offered the functions of magnetically guided drug delivery MRI. *In vitro* the PDT effect of Ce6-MNPs to MGC803 cells was detected by CCK-8 assay. With the increase of drug and light doses, *in vitro* cell viability gradually decreased. *In vivo*, according to the observation from NIR fluorescence imaging and MRI, 8 hours was selected as the suitable time point to implement PDT. Compared to controls, the targeting PDT treatment group (Ce6-MNPs) showed significant level of tumor regression. These results highlighted Ce6-MNPs own excellent imaging and targeting ability without compromising its photodynamic efficacy making them suitable for simultaneous targeting PDT and dual-

mode NIR fluorescence imaging and MRI of different kinds of tumor tissues *in vivo*.

In a recent study, Zheng *et al.* developed a theranostic nanoplatform based on superparamagnetic magnetite nanoparticles [128]. The magnetic nanoparticles were wrapped in a shell of silica covalently encapsulating FITC for fluorescence imaging, using the reverse microemulsion method. These nanoparticles were further embedded in a mesoporous silica shell with the photosensitizer tetra-substituted carboxyl aluminium phthalocyanine (AlC<sub>4</sub>Pc) covalently linked in the mesoporous silica framework. The surface of the nanoplatform was grafted with folic acid to target over-expressed folate receptors of cancer cells. These nanoplatforms without the functionalization with folic acid were used as MRI contrast agents with human hepatoma cells (QGY-7703). PDT experiments performed at 660 nm with these cells led to 70% cell death at a concentration of nanoplatform of 200 µg ml<sup>-1</sup>. Folate-functionalized nanoplatform showed a higher uptake than non-functionalized nano-objects with HeLa cells due to folate receptors-mediated endocytosis. folate-functionalized nanoplatforms led to 60% HeLa cell death after performing PDT experiments.

## CONCLUSION

The novel properties of nanomaterials make them an extremely promising avenue for future technological breakthroughs. In the specific field of PDT, nanoparticle development can overcome most of the shortcomings of classic photosensitizers. The potential advantages of nanoparticles are that a high "payload" can be delivered, they can transport hydrophobic drugs in the blood, their surface can be modified with functional groups and are generally taken up effectively by cells and finally that controlled release of the drug is possible. Moreover, in certain cases, it is also possible to excite the nanoparticles directly to create reactive oxygen species (up conversion nanoparticles, quantum dots, self-lighting nanoparticles).

The first nanoparticle photosensitizer adduct to obtain FDA approval in April 2000 was a liposomal formulation Verteporfin for injection, for the treatment of predominantly classic subfoveal choroidal neovascularisation due to age-related macular degeneration, pathologic myopia or presumed ocular histoplasmosis. Another promising liposomal formulation is the Foslip®, which is *m*THPC encapsulated into dipalmitoyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylglycerol liposomes. Nevertheless knowledge in this field still needs to be improved. More particularly, few studies are performed *in vivo* and the question of long term effects, bioaccumulation and even toxicity of the degraded nanoparticles is still open to question. Moreover, irradiation modalities such as light doses should be taken into account as it is likely than the effect of light would be different using a nanoparticle or a lonely photosensitizer (in terms of diffusion of light for example). To conclude then, although several challenges remain before these nanoparticles can be adopted for clinical use, they probably offer a real hope for extending the reach of PDT to regions deep in the body.

## ABBREVIATIONS

ALA	= 5-aminolevulinic acid
AuNPs	= gold nanoparticles
BTB	= Bromothymol Blue
BCP	= Bromocresol Purple
BDSA	= 9,10-bis [4'-(4''-aminostyryl)styryl]-anthracene
BMPF	= bismethanophosphonate fullerene
C11Pc	= Zn(II)-phthalocyanine disulphide

DMSO	= dimethylsulfoxide
DPBF	= 1,3 diphenylisobenzofuran
EPR	= enhanced permeability and retention
FDA	= Food and Drug Administration
GRAS	= generally recognized as safe
HPPH	= 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl-pyropheophorbide
IP	= iodobenzylpyropheophorbide
MF	= magnetic fluid
Mo-Chl	= molybdenum chlorophyllin
MSN	= mesoporous silica nanoparticles
MRI	= magnetic resonance imaging
MTAP	= <i>meso</i> -tetra( <i>o</i> -aminophenyl) porphyrin
<i>m</i> -THPC	= <i>meta</i> -tetra(hydroxyphenyl)chlorin
<i>m</i> THPP	= <i>meso</i> -tetrahydroxyphenyl porphyrin
MWNTs	= multiwalled carbon nanotubes
NPs	= nanoparticles
ORMOSIL	= organically modified silica
PAA	= polyacrylamide
PAH	= polyallylamine hydrochloride
PC	= phthalocyaninedihydroxyle
<i>Pc</i>	= phthalocyanine
<i>Pc</i> 4	= silicon phthalocyanine 4
<i>Pc</i> 19	= Silicon phthalocyanine 219
PCR	= polymerase chain reaction
PDT	= photodynamic therapy
PEG	= polyethylene glycol
PHPP	= 2,7,12,18-tetramethyl-3,8-di(1-propoxyethyl)-13,17-bis-(3-hydroxypropyl)porphyrin
PpIX	= Protoporphyrin IX
PS	= photosensitizer
PdTHPP	= Pd- <i>meso</i> -tetra(4-carboxyphenyl) porphyrin
PHPP	= 2,7,12,18-tetramethyl-3,8-di(1-propoxyethyl)-13,17-bis-(3-hydroxypropyl)porphyrin
PSS	= polystyrene sulfonate
PUNP	= photon up-converting nanoparticle
ROS	= Reactive Oxygen Species
SDT	= sonodynamic therapy
SWNT	= single walled carbon nanotube
TCPP	= <i>meso</i> -tetra(4-carboxyphenyl)porphin
TPC	= 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin
TPHC	= 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-2,3-dihydrochlorin
TPP	= <i>meso</i> -tetraphenyl porphyrin
TEM	= transmission electron microscopy
UV-Vis	= ultraviolet-visible
ZnPc	= Zinc(II) phthalocyanine

## REFERENCES

- [1] Maisch, T., A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: Antimicrobial photodynamic treatment. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2009**, 9(8), 974-983.



- [2] Robertson, C.A.; Evans, D.H.; Abrahamse, H., Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2009**, *96*(1), 1-8.
- [3] Ortel, B.; Shea, C.R.; Calzavara-Pinton, P., Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Front. biosci. : a journal and virtual library*, **2009**, *14*, 4157-4172.
- [4] Verhille, M.; Couleaud, P.; Vanderesse, R.; Brault, D.; Barberi-Heyob, M.; Frochot, C., Modulation of photosensitization processes for an improved targeted photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*(32), 3925-3943.
- [5] Di Stasio, B.; Frochot, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J.; Müller, A.; Didelon, J.; Guillemain, F.; Viriot, M.L.; Barberi-Heyob, M., The 2-aminogluconamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, *40*(11), 1111-1122.
- [6] Gravier, J.; Schneider, R.; Frochot, C.; Bastogne, T.; Schmitt, F.; Didelon, J.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M., Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and *in vivo* delivery studies. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*(13), 3867-3877.
- [7] Taquet, J.P.; Frochot, C.; Manneville, V.; Barberi-Heyob, M., Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*(15), 1673-1687.
- [8] Soukos, N.S.; Goodson, J.M., Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol.*, **2000**, *2011*, *55*(1), 143-166.
- [9] Pagonis, T.C.; Chen, J.; Fontana, C.R.; Devalapally, H.; Ruggiero, K.; Song, X.; Foschi, F.; Dunham, J.; Skobe, Z.; Yamazaki, H.; Kent, R.; Tanner, A.C.; Amiji, M.M.; Soukos, N.S., Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J. Endod.*, **2010**, *36*(2), 322-328.
- [10] Olivo, M.; Bhuvaneshwari, R.; Lucky, S.S.; Dendukuri, N.; Thong, P.S.P., Targeted therapy of cancer using photodynamic therapy in combination with multi-faceted anti-tumor modalities. *Pharmaceuticals*, **2010**, *3*(5), 1507-1529.
- [11] Hoffman, A.S., The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *J. Controlled Release*, **2008**, *132*(3), 153-163.
- [12] Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochot, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.O., Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale*, **2010**, *2*(7), 1083-1095.
- [13] Vanderesse, R.; Frochot, C.; Barberi-Heyob, M.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.O. In *Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications*, Fundamental Biomedical Technologies A. Prokop Springer Science+Business Media B.V. ed, **2011**; Vol. 5, pp 511-565.
- [14] Cheng, Y.; Burda, C. In *Comprehensive Nanoscience and Technology*; Elsevier: London, **2010**, pp 1-28.
- [15] Nann, T., Nanoparticles in photodynamic therapy. *Nano. Biomed.*, **2011**, *3*(2), 137-143.
- [16] Paszko, E.; Ehrhardt, C.; Senge, M.O.; Kelleher, D.P.; Reynolds, J.V., Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2011**, *8*(1), 14-29.
- [17] Chen, K.; Wacker, M.; Hackbarth, S.; Ludwig, C.; Langer, K.; Roder, B., Photophysical evaluation of mTHPC-loaded chitosan nanoparticles as novel PDT delivery systems. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2010**, *101*(3), 340-347.
- [18] Cohen, E.M.; Ding, H.; Kessinger, C.W.; Khamtong, C.; Gao, J.; Sumer, B.D., Polymeric micelle nanoparticles for photodynamic treatment of head and neck cancer cells. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2010**, *143*(1), 109-115.
- [19] Ding, H.; Sumer, B.D.; Kessinger, C.W.; Dong, Y.; Huang, G.; Boothman, D.A.; Gao, J., Nanoscopic micelle delivery improves the photophysical properties and efficacy of photodynamic therapy of protoporphyrin IX. *J. Controlled Release*, **2011**, *151*(3), 271-277.
- [20] Herlambang, S.; Kumagai, M.; Nomoto, T.; Horie, S.; Fukushima, S.; Oba, M.; Miyazaki, K.; Morimoto, Y.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., Disulfide crosslinked polyion complex micelles encapsulating dendrimer phthalocyanine directed to improved efficiency of photodynamic therapy. *J. Controlled Release*, **2011**, *155*(3), 449-457.
- [21] Zhou, L.; Wang, W.; Feng, Y.; Wei, S.; Zhou, J.; Yu, B.; Shen, J., Delivering a hydrophobic anticancer drug for photodynamic therapy by amorphous formulation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*(21), 6172-6174.
- [22] Marotta, D.E.; Cao, W.; Wileyto, E.P.; Li, H.; Corbin, I.; Rickett, E.; Glickson, J.D.; Chance, B.; Zheng, G.; Busch, T.M., Evaluation of bacteriochlorophyll-reconstituted low-density lipoprotein nanoparticles for photodynamic therapy efficacy *in vivo*. *Nanomedicine*, **2011**, *6*(3), 475-487.
- [23] Ehrhart, J.; Mingotaud, A.F.; Violleau, F., Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering and quasi elastic light scattering for characterization of poly(ethylene glycol)-b-(open)-caprolactone) block copolymer self-assemblies used as drug carriers for photodynamic therapy. *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*(27), 4249-4256.
- [24] Fadel, M.; Kassab, K.; Fadel Doa, A., Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. *Lasers Med. Sci.*, **2010**, *25*(2), 283-272.
- [25] Grimland, J.L.; Wu, C.; Ramoutar, R.R.; Brumaghin, J.L.; McNeill, J., Photosensitizer-doped conjugated polymer nanoparticles with high cross-sections for one- and two-photon excitation. *Nanoscale*, **2011**, *3*(4), 1451-1455.
- [26] Kim, H.; Csaky, K.G., Nanoparticle-integrin antagonist C16Y peptide treatment of choroidal neovascularization in rats. *J. Controlled Release*, **2010**, *142*(2), 286-293.
- [27] Lee, Y.E.; Kopelman, R., Polymeric nanoparticles for photodynamic therapy. *Methods Mol. Biol.*, **2011**, *726*, 151-178.
- [28] Pietkiewicz, J.; Zielińska, K.; Sączko, J.; Kulbacka, J.; Majkowski, M.; Wilk, K.A., New approach to hydrophobic cyanine-type photosensitizer delivery using polymeric oil-cored nanocarriers: Hemolytic activity, *in vitro* cytotoxicity and localization in cancer cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2010**, *39*(5), 322-335.
- [29] Shieh, M.J.; Hsu, C.Y.; Huang, L.Y.; Chen, H.Y.; Huang, F.H.; Lai, P.S., Reversal of doxorubicin-resistance by multifunctional nanoparticles in MCF-7/ADR cells. *J. Controlled Release*, **2011**, *152*(3), 418-425.
- [30] Navarro, F.P.; Bechet, D.; Delmas, T.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Verhille, M.; Kamarulzaman, E.; Vanderesse, R.; Boisseau, P.; Texier, I.; Gravier, J.; Vinet, F.; Barberi-Heyob, M.; Couffin, A.C. In *Proc. SPIE* **2011**; Vol. 7886, pp 78860Y/78861-78860Y/78812.
- [31] Chen, J.X.; Wang, H.Y.; Li, C.; Han, K.; Zhang, X.Z.; Zhuo, R.X., Construction of surfactant-like tetra-tail amphiphilic peptide with RGD ligand for encapsulation of porphyrin for photodynamic therapy. *Biomaterials*, **2011**, *32*(6), 1678-1684.
- [32] Jeong, H.; Huh, M.; Lee So, J.; Koo, H.; Kwon Ick, C.; Jeong Seo, Y.; Kim, K., Photosensitizer-conjugated human serum albumin nanoparticles for effective photodynamic therapy. *Theranostics*, **2011**, *1*, 230-239.
- [33] Preuß, A.; Chen, K.; Hackbarth, S.; Wacker, M.; Langer, K.; Roeder, B., Photosensitizer loaded HSA nanoparticles II: *In vitro* investigations. *Int. J. Pharm.*, **2011**, *404*(1-2), 308-316.
- [34] Wacker, M.; Chen, K.; Preuß, A.; Possemeyer, K.; Roeder, B.; Langer, K., Photosensitizer loaded HSA nanoparticles. I: Preparation and photophysical properties. *Int. J. Pharm.*, **2010**, *393*(1-2), 253-262.
- [35] Bae, B.-C.; Na, K., Self-quenching polysaccharide-based nanogels of pullulan/folate-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. *Biomaterials*, **2010**, *31*(24), 6325-6335.
- [36] Hah, H.J.; Kim, G.; Lee, Y.-E.K.; Orringer, D.A.; Sagher, O.; Philbert, M.A.; Kopelman, R., Methylene blue-conjugated hydrogel nanoparticles and tumor-cell targeted photodynamic therapy. *Macromol. Biosci.*, **2011**, *11*(1), 90-99.
- [37] Lee, S.J.; Koo, H.; Jeong, H.; Huh, M.S.; Choi, Y.; Jeong, S.Y.; Byun, Y.; Choi, K.; Kim, K.; Kwon, I.C., Comparative study of photosensitizer loaded and conjugated glycol chitosan nanoparticles for cancer therapy. *J. Controlled Release*, **2011**, *152*(1), 21-29.
- [38] Lee, S.J.; Koo, H.; Lee, D.-E.; Min, S.; Lee, S.; Chen, X.; Choi, Y.; Leary, J.F.; Park, K.; Jeong, S.Y.; Kwon, I.C.; Kim, K.; Choi, K., Tumor-homing photosensitizer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/off system. *Biomaterials*, **2011**, *32*(16), 4021-4029.
- [39] Schmitt, F.; Lagopoulos, L.; Käuper, P.; Rossi, N.; Busso, N.; Barge, J.; Wagnières, G.; Laue, C.; Wandrey, C.; Juillerat-Jeanneret, L., Chitosan-based nanogels for selective delivery of photosensitizers to macrophages and improved retention in and therapy of arthritic joints. *J. Controlled Release*, **2010**, *144*(2), 242-250.
- [40] Yang, S.J.; Lin, F.H.; Tsai, H.M.; Lin, C.F.; Chin, H.C.; Wong, J.M.; Shieh, M.J., Alginate-folic acid-modified chitosan nanoparticles for photodynamic detection of intestinal neoplasms. *Biomaterials*, **2011**, *32*(8), 2174-2182.
- [41] Lu, H.L.; Syu, W.J.; Nishiyama, N.; Kataoka, K.; Lai, P.S., Dendrimer phthalocyanine-encapsulated polymeric micelle-mediated photochemical internalization extends the efficacy of photodynamic therapy and overcomes drug-resistance *in vivo*. *J. Control Release*, **2011**, *153*(3), 458-464.
- [42] Lim, C.-K.; Shin, J.; Lee, Y.-D.; Kim, J.; Park, H.; Kwon Ick, C.; Kim, S., Heavy-atomic construction of photosensitizer nanoparticles for enhanced photodynamic therapy of cancer. *Small*, **2011**, *7*(1), 112-118.
- [43] Bechet, D.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Viriot, M.L.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M., Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.*, **2008**, *26*(11), 612-621.
- [44] Thomas, N.; Pernot, M.; Vanderesse, R.; Becuwe, P.; Kamarulzaman, E.; Da Silva, D.; François, A.; Frochot, C.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M., Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties. *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, *80*(2), 226-235.
- [45] Thomas, N.; Tirand, L.; Chatelut, E.; Plégnat, F.; Frochot, C.; Dodeller, M.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M., Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPFR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, *7*(4), 433-441.
- [46] Hone, D.C.; Walker, P.I.; Evans-Gowing, R.; FitzGerald, S.; Beeby, A.; Chambrier, I.; Cook, M.J.; Russell, D.A., Generation of cytotoxic singlet oxygen via phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles: A potential delivery vehicle for photodynamic therapy. *Langmuir*, **2002**, *18*(8), 2985-2987.
- [47] Wieder, M.E.; Hone, D.C.; Cook, M.J.; Handsley, M.M.; Gavrilovic, J.; Russell, D.A., Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: Cancer therapy using a 'Trojan horse'. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2006**, *5*(8), 727-734.
- [48] Demberelyamba, D.; Ariunaa, M.; Shin, Y.K., Newly synthesized water soluble Cholinium-Purpurin photosensitizers and their stabilized gold nanoparticles as promising anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences*, **2008**, *9*(5), 864-871.
- [49] Oo, M.K.K.; Yang, X.; Du, H.; Wang, H., 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer. *Nanomedicine*, **2008**,



- 3(6), 777-786.
- [50] Cheng, Y.; C. Samia, A.; Meyers, J.D.; Panagopoulos, I.; Fei, B.; Burda, C., Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for *in vivo* photodynamic therapy of cancer. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*(32), 10643-10647.
- [51] Cheng, Y.; Samia, A.C.; Meyers, J.D.; Panagopoulos, I.; Fei, B.; Burda, C.; Gonzales, M.A.; Mascharak, P.K., Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for *in vivo* photodynamic therapy of cancer. *Chemtracts*, **2008**, *21*(9), 329-335.
- [52] Kuo, W.S.; Chang, C.N.; Chang, Y.T.; Yeh, C.S., Antimicrobial gold nanorods with dual-modality photodynamic inactivation and hyperthermia. *Chem. Commun.*, **2009**(32), 4853-4855.
- [53] Kuo, W.S.; Chang, C.N.; Chang, Y.T.; Yang, M.H.; Chien, Y.H.; Chen, S.J.; Yeh, C.S., Gold nanorods in photodynamic therapy, as hyperthermia agents, and in near-infrared optical imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*(15), 2711-2715.
- [54] Camerin, M.; Magaraglia, M.; Soncin, M.; Jori, G.; Moreno, M.; Chambrier, I.; Cook Michael, J.; Russell David, A., The *in vivo* efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. *Eur. J. Cancer*, **2010**, *46*(10), 1910-1918.
- [55] Záruba, K.; Králová, J.; Oezanka, P.; Poučková, P.; Veverková, L.; Král, V., Modified porphyrin-brucine conjugated to gold nanoparticles and their application in photodynamic therapy. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*(14), 3202-3206.
- [56] Cheng, Y.; Meyers, J.D.; Broome, A.M.; Kenney, M.E.; Basilion, J.P.; Burda, C., Deep penetration of a PDT drug into tumors by noncovalent drug-gold nanoparticle conjugates. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*(8), 2583-2591.
- [57] Stuchinskaya, T.; Moreno, M.; Cook, M.J.; Edwards, D.R.; Russell, D.A., Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, *10*(5), 822-831.
- [58] Reum, N.; Fink-Straube, C.; Klein, T.; Hartmann, R.W.; Lehr, C.M.; Schneider, M., Multilayer coating of gold nanoparticles with drug-polymer coadsorbates. *Langmuir*, **2010**, *26*(22), 16901-16908.
- [59] Reum, N.; Fink-Straube, C.; Klein, T.; Hartmann, R.W.; Lehr, C.M.; Schneider, M., Erratum: Multilayer coating of gold nanoparticles with drug-polymer coadsorbates (Langmuir (2010) 26 (16901)). *Langmuir*, **2011**, *27*(2), 861.
- [60] Yan, F.; Kopelman, R., The Embedding of Meta-tetra(Hydroxyphenyl)-Chlorin into Silica Nanoparticle Platforms for Photodynamic Therapy and Their Singlet Oxygen Production and pH-dependent Optical Properties. *Photochem. Photobiol.*, **2003**, *78*(6), 587-591.
- [61] Roy, I.; Ohulchanskyy, T.Y.; Pudavar, H.E.; Bergey, E.J.; Oseroff, A.R.; Morgan, J.; Dougherty, T.J.; Prasad, P.N., Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*(26), 7860-7865.
- [62] Tang, W.; Xu, H.; Kopelman, R.; Philbert, M.A., Photodynamic characterization and *in vitro* application of methylene blue-containing nanoparticle platforms. *Photochem. Photobiol.*, **2005**, *81*(2), 242-249.
- [63] Davydenko, M.O.; Radechenko, E.O.; Yashchuk, V.M.; Dmitruk, I.M.; Prylutsky, Y.I.; Matishevska, O.P.; Golub, A.A., Sensibilization of fullerene C60 immobilized at silica nanoparticles for cancer photodynamic therapy. *J. Mol. Liq.*, **2006**, *127*(1-3), 145-147.
- [64] Gao, D.; Agayan, R.R.; Xu, H.; Philbert, M.A.; Kopelman, R., Nanoparticles for two-photon photodynamic therapy in living cells. *Nano Lett.*, **2006**, *6*(11), 2383-2386.
- [65] Kim, S.; Ohulchanskyy, T.Y.; Pudavar, H.E.; Pandey, R.K.; Prasad, P.N., Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*(9), 2669-2675.
- [66] Ohulchanskyy, T.Y.; Roy, I.; Goswami, L.N.; Chen, Y.; Bergey, E.J.; Pandey, R.K.; Oseroff, A.R.; Prasad, P.N., Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Nano Lett.*, **2007**, *7*(9), 2835-2842.
- [67] Zhou, J.; Zhou, L.; Dong, C.; Feng, Y.; Wei, S.; Shen, J.; Wang, X., Preparation and photodynamic properties of water-soluble hypocrellin A-silica nanospheres. *Mater. Lett.*, **2008**, *62*(17-18), 2910-2913.
- [68] Zhou, L.; Liu, J.H.; Zhang, J.; Wei, S.H.; Feng, Y.Y.; Zhou, J.H.; Yu, B.Y.; Shen, J., A new sol-gel silica nanovehicle preparation for photodynamic therapy *in vitro*. *Int. J. Pharm.*, **2010**, *386*(1-2), 131-137.
- [69] Rossi, L.M.; Silva, P.R.; Vono, L.L.R.; Fernandes, A.U.; Tada, D.B.; Baptista, M.S., Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: Preparation, optical properties and singlet oxygen generation. *Langmuir*, **2008**, *24*(21), 12534-12538.
- [70] Qian, J.; Gharibi, A.; He, S., Colloidal mesoporous silica nanoparticles with protoporphyrin IX encapsulated for photodynamic therapy. *Journal of biomedical optics*, **2009**, *14*(1), 014012.
- [71] Compagnin, C.; Ba, L.; Mognato, M.; Celotti, L.; Miotto, G.; Arduini, M.; Moret, F.; Fede, C.; Selvestrel, F.; Echevarria, I.M.R.; Mancini, F.; Reddi, E., The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins. *Nanotechnology*, **2009**, *20*(34).
- [72] Zhao, B.; Yin, J.J.; Bilski, P.J.; Chignell, C.F.; Roberts, J.E.; He, Y.Y., Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2009**, *241*(2), 163-172.
- [73] Velusamy, M.; Shen, J.Y.; Lin, J.T.; Lin, Y.C.; Hsieh, C.C.; Lai, C.H.; Lai, C.W.; Ho, M.L.; Chen, Y.C.; Chou, P.T.; Hsiao, J.K., A new series of quadrupolar type two-photon absorption chromophores bearing 11, 12-dibutoxydibenzof[a,c]-phenazine bridged amines; their applications in two-photon fluorescence imaging and two-photon photodynamic therapy. *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, *19*(15), 2388-2397.
- [74] He, X.; Wu, X.; Wang, K.; Shi, B.; Hai, L., Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous *in vivo* imaging and photodynamic therapy. *Biomaterials*, **2009**, *30*(29), 5601-5609.
- [75] Tu, H.L.; Lin, Y.S.; Lin, H.Y.; Hung, Y.; Lo, L.W.; Chen, Y.F.; Mou, C.Y., *In vitro* studies of functionalized mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Adv. Mater.*, **2009**, *21*(2), 172-177.
- [76] Cheng, S.H.; Lee, C.H.; Yang, C.S.; Tseng, F.G.; Mou, C.Y.; Lo, L.W., Mesoporous silica nanoparticles functionalized with an oxygen-sensing probe for cell photodynamic therapy: Potential cancer theranostics. *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*(9), 1252-1257.
- [77] Brevet, D.; Gary-Bobo, M.; Raehm, L.; Richeter, S.; Hocine, O.; Amro, K.; Look, B.; Couleaud, P.; Frochet, C.; Morère, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.O., Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Chem. Commun.*, **2009**(12), 1475-1477.
- [78] Zhang, R.; Wu, C.; Tong, L.; Tang, B.; Xu, Q.H., Multifunctional core-shell nanoparticles as highly efficient imaging and photosensitizing agents. *Langmuir*, **2009**, *25*(17), 10153-10158.
- [79] Simon, V.; Devaux, C.; Darmon, A.; Donnet, T.; Thienot, E.; Germain, M.; Honnorat, J.; Duval, A.; Pottier, A.; Borghi, E.; Levy, L.; Marill, J., Pp IX silica nanoparticles demonstrate differential interactions with *in vitro* tumor cell lines and *in vivo* mouse models of human cancers. *Photochem. Photobiol.*, **2010**, *86*(1), 213-222.
- [80] Yang, Y.; Song, W.; Wang, A.; Zhu, P.; Fei, J.; Li, J., Lipid coated mesoporous silica nanoparticles as photosensitive drug carriers. *PCCP*, **2010**, *12*(17), 4418-4422.
- [81] Guo, H.; Qian, H.; Idris, N.M.; Zhang, Y., Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer. *Nanomedicine*, **2010**, *6*(3), 486-495.
- [82] Hocine, O.; Gary-Bobo, M.; Brevet, D.; Maynadier, M.; Fontanel, S.; Raehm, L.; Richeter, S.; Look, B.; Couleaud, P.; Frochet, C.; Charnay, C.; Derrien, G.; Smalhi, M.; Sahnoune, A.; Morère, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.O., Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles for photodynamic therapy. *Int. J. Pharm.*, **2010**, *402*(1-2), 221-230.
- [83] Li, Z.; Wang, J.; Chen, J.; Lei, W.; Wang, X.; Zhang, B., pH-responsive silica nanoparticles for controllable O<sub>2</sub> generation. *Nanotechnology*, **2010**, *21*(11), 115102/115101-115102/115106.
- [84] Thienot, E.; Germain, M.; Piejos, K.; Simon, V.; Darmon, A.; Marill, J.; Borghi, E.; Levy, L.; Hocheid, J.F.; Pottier, A., One pot synthesis of new hybrid versatile nanocarrier exhibiting efficient stability in biological environment for use in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2010**, *100*(1), 1-9.
- [85] Couleaud, P.; Bechet, D.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M.; Faure, A.C.; Roux, S.; Tillement, O.; Porhel, S.; Guillemin, F.; Frochet, C., Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanomedicine*, **2011**, DOI:10.2217/NNM.11.31.
- [86] Zhang, P.; Steelant, W.; Kumar, M.; Scholfield, M., Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*(15), 4526-4527.
- [87] Qian, H.S.; Guo, H.C.; Ho, P.C.L.; Mahendran, R.; Zhang, Y., Mesoporous-silica-coated up-conversion fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy. *Small*, **2009**, *5*(20), 2285-2290.
- [88] Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z., Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy. *Biomaterials*, **2011**, *32*(4), 1110-1120.
- [89] Wang, C.; Tao, H.; Cheng, L.; Liu, Z., Near-infrared light induced *in vivo* photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles. *Biomaterials*, **2011**, *32*(26), 6145-6154.
- [90] Timoshenko, V.Y.; Kudryavtsev, A.A.; Osminkina, L.A.; Vorontsov, A.S.; Ryabchikov, Y.V.; Belogorokhov, I.A.; Kovalev, D.; Kashkarov, P.K., Silicon nanocrystals as photosensitizers of active oxygen for biomedical applications. *JETP Letters*, **2006**, *83*(9), 423-426.
- [91] Rioux, D.; Laferrière, M.; Douplik, A.; Shah, D.; Lilge, L.; Kabashin, A.V.; Meunier, M.M., Silicon nanoparticles produced by femtosecond laser ablation in water as novel contamination-free photosensitizers. *J. Biomed. Optics*, **2009**, *14*(2).
- [92] Zhu, Z.; Tang, Z.; Phillips, J.A.; Yang, R.; Wang, H.; Tan, W., Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*(33), 10856-10857.
- [93] Erbas, S.; Gorgulu, A.; Kocakuskogullari, M.; Akkaya, E.U., Non-covalent functionalized SWNTs as delivery agents for novel Bodipy-based potential PDT sensitizers. *Chem. Commun.*, **2009**(33), 4956-4958.
- [94] do Nascimento, G.M.; de Oliveira, R.C.; Pradie, N.A.; Lins, P.R.G.; Worfel, P.R.; Martinez, G.R.; Di Mascio, P.; Dresselhaus, M.S.; Corio, P., Single-wall carbon nanotubes modified with organic dyes: Synthesis, characterization and potential cytotoxic effects. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2010**, *211*(2-3), 99-107.

- [95] Cai, R.; Kubota, Y.; Shuin, T.; Sakai, H.; Hashimoto, K.; Fujishima, A., Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO<sub>2</sub> particles. *Cancer Res.*, **1992**, *52*(8), 2346-2348.
- [96] Kubota, Y.; Shuin, T.; Kawasaki, C.; Hosaka, M.; Kitamura, H.; Cai, R.; Sakai, H.; Hashimoto, K.; Fujishima, A., Photokilling of T-24 human bladder cancer cells with titanium dioxide. *Br. J. Cancer*, **1994**, *70*(6), 1107-1111.
- [97] Hefia, L.J.F.; Neumaier, M.; Shively, J.E., Kinetic and affinity constants of epitope specific anti-carcinoembryonic antigen (CEA) monoclonal antibodies for CEA and engineered CEA domain constructs. *Immunotechnology*, **1998**, *4*(1), 49-57.
- [98] Hirohara, S.; Ohata, M.; Ogata, S.I.; Ohtsuki, C.; Higashida, S.; Ogura, S.I.; Okura, I.; Takenaka, M.; Ono, H.; Sugai, Y.; Mikata, Y.; Tanihara, M.; Yano, S., Cellular uptake and photocytotoxicity of glycoconjugated chlorins in HeLa cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2005**, *78*(1), 7-15.
- [99] Ogura, S.I.; Yazaki, K.; Yamaguchi, K.; Kamachi, T.; Okura, I., Localization of poly-L-lysine-photosensitizer conjugate in nucleus. *J. Controlled Release*, **2005**, *103*(1), 1-6.
- [100] Tokuoka, Y.; Yamada, M.; Kawashima, N.; Miyasaka, T., Anticancer effect of dye-sensitized TiO<sub>2</sub> nanocrystals by polychromatic visible light irradiation. *Chem. Lett.*, **2006**, *35*(5), 496-497.
- [101] Lei, W.; Zhou, Q.; Li, Z.; Wang, X.; Zhang, B., Photodynamic activity of ascorbic acid-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles under visible illumination (>550nm). *Chem. Lett.*, **2009**, *38*(12), 1138-1139.
- [102] Takahashi, M.; Ueno, A.; Uda, T.; Mihara, H., Design of novel porphyrin-binding peptides based on antibody CDR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*(15), 2023-2026.
- [103] López, T.; Figueras, F.; Manjarrez, J.; Bustos, J.; Alvarez, M.; Silvestre-Albero, J.; Rodríguez-Reinoso, F.; Martínez-Ferre, A.; Martínez, E., Catalytic nanomedicine: A new field in antitumor treatment using supported platinum nanoparticles. *In vitro* DNA degradation and *in vivo* tests with C6 animal model on Wistar rats. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *45*(5), 1982-1990.
- [104] López, T.; Ortiz, E.; Alvarez, M.; Navarrete, J.; Odrizola, J.A.; Martínez-Ortega, F.; Páez-Mozo, E.A.; Escobar, P.; Espinoza, K.A.; Rivero, I.A., Study of the stabilization of zinc phthalocyanine in sol-gel TiO<sub>2</sub> for photodynamic therapy applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2010**, *6*(6), 777-785.
- [105] Ogino, C.; Shibata, N.; Sasaki, R.; Takaki, K.; Miyachi, Y.; Kuroda, S.I.; Nimomiya, K.; Shimizu, N., Construction of protein-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles for use with ultrasound irradiation in a novel cell injuring method. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*(17), 5320-5325.
- [106] Liu, L.; Miao, P.; Xu, Y.; Tian, Z.; Zou, Z.; Li, G., Study of Pt/TiO<sub>2</sub> nanocomposite for cancer-cell treatment. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2010**, *98*(3), 207-210.
- [107] Yamaguchi, S.; Kobayashi, H.; Narita, T.; Kanehira, K.; Sonezaki, S.; Kubota, Y.; Terasaka, S.; Iwasaki, Y., Novel photodynamic therapy using water-dispersed TiO<sub>2</sub> polyethylene glycol compound: Evaluation of antitumor effect on glioma cells and spheroids *in vitro*. *Photochem. Photobiol.*, **2011**, *86*(4), 964-971.
- [108] Yamaguchi, S.; Kobayashi, H.; Narita, T.; Kanehira, K.; Sonezaki, S.; Kudo, N.; Kubota, Y.; Terasaka, S.; Houkin, K., Sonodynamic therapy using water-dispersed TiO<sub>2</sub>-polyethylene glycol compound on glioma cells: Comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy. *Ultrason. Sonochem.*, **2011**, *18*(5), 1197-1204.
- [109] Harada, Y.; Ogawa, K.; Irie, Y.; Endo, H.; Feril Jr, L.B.; Uemura, T.; Tachibana, K., Ultrasound activation of TiO<sub>2</sub> in melanoma tumors. *J. Controlled Release*, **2011**, *149*(2), 190-195.
- [110] Liu, Y.; Zhang, Y.; Wang, S.; Pope, C.; Chen, W., Optical behaviors of ZnO-porphyrin conjugates and their potential applications for cancer treatment. *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, *92*(14).
- [111] Hiromitsu, I.; Ikeue, T.; Karino, K.; Ohno, T.; Tanaka, S.; Shiratori, H.; Morito, S.; Fujita, Y.; Handa, M., Photoinduced energy transfer in ZnO-tetraphenylporphyrin systems. *Chem. Phys. Lett.*, **2009**, *474*(4-6), 315-319.
- [112] Hiromitsu, I.; Kawami, A.; Tanaka, S.; Morito, S.; Sasaki, R.; Ikeue, T.; Fujita, Y.; Handa, M., Luminescence of tetraphenylporphyrin by an energy transfer from photoexcited ZnO nanoparticle. *Chem. Phys. Lett.*, **2011**, *501*(4-6), 385-389.
- [113] Zhang, H.; Chen, B.; Jiang, H.; Wang, C.; Wang, H.; Wang, X., A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment. *Biomaterials*, **2011**, *32*(7), 1906-1914.
- [114] Zhang, Y.; Chen, W.; Wang, S.; Liu, Y.; Pope, C., Phototoxicity of zinc oxide nanoparticle conjugates in human ovarian cancer NIH: OVCAR-3 cells. *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2008**, *4*(4), 432-438.
- [115] Kantonis, G.; Trikeriotis, M.; Ghanotakis, D.F., Biocompatible protoporphyrin IX-containing nanohybrids with potential applications in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2007**, *185*(1), 62-66.
- [116] Epple, M.; Ganesan, K.; Heumann, R.; Klesing, J.; Kovtun, A.; Neumann, S.; Sokolova, V., Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*(1), 18-23.
- [117] Strassert, C.A.; Otter, M.; Albuquerque, R.Q.; Hone, A.; Vida, Y.; Maier, B.; De Cola, L., Photoactive hybrid nanomaterial for targeting, labeling, and killing antibiotic-resistant bacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*(42), 7928-7931.
- [118] Ross, B.; Rehemtulla, A.; Koo, Y.E.L.; Reddy, R.; Kim, G.; Behrend, C.; Buck, S.; Schneider, R.J.; Philbert, M.A.; Weissleder, R.; Kopelman, R. In *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, Cartwright, A.N., Ed.; San Jose, CA, **2004**; Vol. 5331, pp 76-83.
- [119] Kopelman, R.; Lee Koo, Y.E.; Philbert, M.; Moffat, B.A.; Ramachandra Reddy, G.; McConville, P.; Hall, D.E.; Chenevert, T.L.; Bhojani, M.S.; Buck, S.M.; Rehemtulla, A.; Ross, B.D., Multifunctional nanoparticle platforms for *in vivo* MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer. *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, *293*(1), 404-410.
- [120] Reddy, G.R.; Bhojani, M.S.; McConville, P.; Moody, J.; Moffat, B.A.; Hall, D.E.; Kim, G.; Koo, Y.E.L.; Woolliscroft, M.J.; Sugai, J.V.; Johnson, T.D.; Philbert, M.A.; Kopelman, R.; Rehemtulla, A.; Ross, B.D., Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*(22), 6677-6686.
- [121] Tada, D.B.; Vono, L.L.R.; Duarte, E.L.; Itri, R.; Kiyohara, P.K.; Baptista, M.S.; Rossi, L.M., Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: A potential magnetic carrier for photodynamic therapy. *Langmuir*, **2007**, *23*(15), 8194-8199.
- [122] Lai, C.W.; Wang, Y.H.; Lai, C.H.; Yang, M.J.; Chen, C.Y.; Chou, P.T.; Chan, C.S.; Chi, Y.; Chen, Y.C.; Hsiao, J.K., Iridium-complex-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> core/shell nanoparticles: A facile three-in-one system in magnetic resonance imaging, luminescence imaging, and photodynamic therapy. *Small*, **2008**, *4*(2), 218-224.
- [123] McCarthy, J.R.; Jaffer, F.A.; Weissleder, R., A macrophage-targeted theranostic nanoparticle for biomedical applications. *Small*, **2006**, *2*(8-9), 983-987.
- [124] McCarthy, J.R.; Korngold, E.; Weissleder, R.; Jaffer, F.A., A light-activated theranostic nanoagent for targeted macrophage ablation in inflammatory atherosclerosis. *Small*, **2010**, *6*(18), 2041-2049.
- [125] Liu, F.; Zhou, X.; Ni, S.; Wang, X.; Zhou, Y.; Chen, Z., Preparation and properties of photosensitizer loaded magnetic nanocarriers. *Curr. Nanosci.*, **2009**, *5*(3), 293-296.
- [126] Chen, Z.L.; Sun, Y.; Huang, P.; Yang, X.X.; Zhou, X.P., Studies on preparation of photosensitizer loaded magnetic silica nanoparticles and their anti-tumor effects for targeting photodynamic therapy. *Nanoscale Res. Lett.*, **2009**, *4*(5), 400-408.
- [127] Kim, S.; Ohulchanskyy, T.Y.; Bharali, D.; Chen, Y.; Pandey, R.K.; Prasad, P.N., Organically modified silica nanoparticles with intraparticle heavy-atom effect on the encapsulated photosensitizer for enhanced efficacy of photodynamic therapy. *J. Phys. Chem. C*, **2009**, *113*(29), 12641-12644.
- [128] Wang, F.; Chen, X.; Zhao, Z.; Tang, S.; Huang, X.; Lin, C.; Cai, C.; Zheng, N., Synthesis of magnetic, fluorescent and mesoporous core-shell-structured nanoparticles for imaging, targeting and photodynamic therapy. *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*(30), 11244-11252.
- [129] Wenger, Y.; Schneider, R.J.; Reddy, G.R.; Kopelman, R.; Joliet, O.; Philbert, M.A., Tissue distribution and pharmacokinetics of stable polyacrylamide nanoparticles following intravenous injection in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2011**, *251*(3), 181-190.
- [130] Primo, F.L.; Cordo, P.L.A.G.; Neto, A.F.; Morais, P.C.; Tedesco, A.C. In *AIP Conference Proceedings*; Rostock, **2010**; Vol. 1311, pp 293-297.
- [131] Huang, P.; Li, Z.; Lin, J.; Yang, D.; Gao, G.; Xu, C.; Bao, L.; Zhang, C.; Wang, K.; Song, H.; Hu, H.; Cui, D., Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for *in vivo* simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy. *Biomaterials*, **2011**, *32*(13), 3447-3458.
- [132] Yang, X.; Wan, Y.; Qiao, X.; Arlet, V.; Li, X., Transcriptional alteration of matrix-related gene expression in cultured human disc cells by nanoparticles of a bis(methanophosphonate) fullerene. *Cell Biol. Int.*, **2010**, *34*(8), 837-844.
- [133] Bauer, B.; Chen, S.; Käll, M.; Gunnarsson, L.; Ericson, M.B. In *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*; San Francisco, CA, **2011**; Vol. 7897.
- [134] Cheng, Y.; Samia, A.C.; Li, J.; Kenney, M.E.; Resnick, A.; Burda, C., Delivery and efficacy of a cancer drug as a function of the bond to the gold nanoparticle surface. *Langmuir*, **2010**, *26*(4), 2248-2255.
- [135] Gallavardin, T.; Maurin, M.; Marotte, S.; Simon, T.; Gabudean, A.M.; Bretonnière, Y.; Lindgren, M.; Lerouge, F.; Baldeck, P.L.; Stéphan, O.; Leverrier, Y.; Marvel, J.; Parola, S.; Maury, O.; Andraud, C., Photodynamic therapy and two-photon bio-imaging applications of hydrophobic chromophores through amphiphilic polymer delivery. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2010**, *10*(7), 1216-1225.
- [136] Tirand, L.; Frochet, C.; Vandresse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M.L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J. Controlled Release*, **2006**, *111*(1-2), 153-164.
- [137] Benachour, H.; Frochet, C.; Vandresse, R.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. In *Brain cancer, targeting strategies and cervical cancer*; Nova Publishers: New York, **2011**, pp 738-753.
- [138] Kamarulzaman, E.E.; Benachour, H.; Barberi-Heyob, M.; Frochet, C.; Wahab, H.A.; Guillemin, F.; Vandresse, R. In *Advances in Cancer Therapy*. Gali-Mohtaseb, Ed.; InTech: New York, **2011**; Vol. 3.
- [139] Pantarotto, D.; Briand, J.P.; Prato, M.; Bianco, A., Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem. Commun. (Cambridge, England)*, **2004**(1), 16-17.
- [140] Kam, N.W.S.; Jessop, T.C.; Wender, P.A.; Dai, H., Nanotube molecular transporters: Internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*(22), 6850-6851.
- [141] Kostarelou, K.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.



- Luangsivilay, J.; Godefroy, S.; Pantarotto, D.; Briand, J.P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A., Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature Nanotechnology*, **2007**, *2*(2), 108-113.
- [142] Liu, Z.; Davis, C.; Cai, W.; He, L.; Chen, X.; Dai, H., Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*(5), 1410-1415.
- [143] Hirsch, A., Functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*(11), 1853-1859.
- [144] Qu, L.; Martin, R.B.; Huang, W.; Fu, K.; Zweifel, D.; Lin, Y.; Sun, Y.P.; Bunker, C.E.; Harruff, B.A.; Gord, J.R.; Allard, L.F., Interactions of functionalized carbon nanotubes with tethered pyrenes in solution. *J. Chem. Phys.*, **2002**, *117*(17), 8089-8094.
- [145] Matsunaga, T.; Tomoda, R.; Nakajima, T.; Wake, H., Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiol. Lett.*, **1985**, *29*(1-2), 211-214.
- [146] Cai, R.; Hashimoto, K.; Itoh, K.; Kubota, Y.; Fujishima, A., Photokilling of malignant cells with ultrafine TiO<sub>2</sub> powder. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, *64*(4), 1268-1273.
- [147] Fujishima, A.; Rao, T.N.; Tryk, D.A., Titanium dioxide photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **2000**, *1*(1), 1-21.
- [148] Fujishima, A.; Zhang, X., Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches. *Comptes Rendus Chimie*, **2006**, *9*(5-6), 750-760.
- [149] Sakai, A.H.; Cai, R.X.; Yoshioka, T.; Kubota, Y.; Hashimoto, K.; Fujishima, A., Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration change of T24 cell under irradiation in the presence of TiO<sub>2</sub> ultrafine particles. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, **1994**, *1201*(2), 259-265.
- [150] Wamer, W.G.; Yin, J.J.; Wei, R.R., Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radic. Biol. Med.*, **1997**, *23*(6), 851-858.
- [151] Zhang, A.P.; Sun, Y.P., Photocatalytic killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on Ls-174t human colon carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.*, **2004**, *10*(21), 3191-3193.
- [152] Dorfman, A.; Kumar, N.; Hahn, J.J., Highly sensitive biomolecular fluorescence detection using nanoscale ZnO platforms. *Langmuir*, **2006**, *22*(11), 4890-4895.
- [153] Rasmussen, J.W.; Martinez, E.; Louka, P.; Wingett, D.G., Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2010**, *7*(9), 1063-1077.
- [154] Van De Walle, C.G., Hydrogen as a cause of doping in zinc oxide. *Phys. Rev. Lett.*, **2000**, *85*(5), 1012-1015.
- [155] Guo, D.; Wu, C.; Jiang, H.; Li, Q.; Wang, X.; Chen, B., Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2008**, *93*(3), 119-126.
- [156] Kemikli, N.; Kavas, H.; Kazan, S.; Baykal, A.; Ozturk, R., Synthesis of protoporphyrin coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles via dopamine anchor. *J. Alloys Compd.*, **2010**, *502*(2), 439-444.
- [157] Sun, C.; Lee, J.S.H.; Zhang, M., Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, **2008**, *60*(11), 1252-1265.
- [158] Veisoh, O.; Gunn, J.W.; Zhang, M., Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Del. Rev.*, **2010**, *62*(3), 284-304.
- [159] Xu, C.; Xu, K.; Gu, H.; Zheng, R.; Liu, H.; Zhang, X.; Guo, Z.; Xu, B., Dopamine as A Robust Anchor to Immobilize Functional Molecules on the Iron Oxide Shell of Magnetic Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*(32), 9938-9939.
- [160] Ito, H.; Kato, R.; Ino, K.; Honda, H., Magnetic manipulation device for the optimization of cell processing conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, **2010**, *109*(2), 182-188.
- [161] Jain, T.K.; Foy, S.P.; Erokwu, B.; Dimitrijevic, S.; Flask, C.A.; Labhasetwar, V., Magnetic resonance imaging of multifunctional pluronic stabilized iron-oxide nanoparticles in tumor-bearing mice. *Biomaterials*, **2009**, *30*(35), 6748-6756.
- [162] Yang, F.; Li, Y.; Chen, Z.; Zhang, Y.; Wu, J.; Gu, N., Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-embedded encapsulated microbubbles as dual contrast agents of magnetic resonance and ultrasound imaging. *Biomaterials*, **2009**, *30*(23-24), 3882-3890.
- [163] Yellen, B.B.; Forbes, Z.G.; Halverson, D.S.; Fridman, G.; Barbee, K.A.; Chorny, M.; Levy, R.; Friedman, G., Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications. *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, *293*(1), 647-654.
- [164] Zhao, D.L.; Wang, X.X.; Zeng, X.W.; Xia, Q.S.; Tang, J.T., Preparation and inductive heating property of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan composite nanoparticles in an AC magnetic field for localized hyperthermia. *J. Alloys Compd.*, **2009**, *477*(1-2), 739-743.
- [165] Mistlberger, G.; Klimant, I., Luminescent magnetic particles: Structures, syntheses, multimodal imaging, and analytical applications. *Bioanalytical Reviews*, **2010**, *2*(1), 61-101.
- [166] Tassa, C.; Shaw, S.Y.; Weissleder, R., Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles: A Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging, Molecular Diagnostics, and Therapy. *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*(10), 842-852.

**Auteurs: Frochot C., Sève A., Vanderesse R., Toussain M., Barberi-Heyob M.**

**Titre:Silica-based nanoparticles for PDT**

**Abstract:** This chapter deals with the potential of silica-based nanoparticles for applications in PDT. Only the more recent papers will be discussed in details and a table will put together all the publications concerning silica nanoparticles for PDT applications. Photosensitizers can be encapsulated or covalently attached. Synthesis of silica-based nanoparticles is relatively easy, leading to the elaboration of complex multifunctional nanoparticles than can present targeting units, a photoactivatable compound such as a photosensitizer as well as a chemical agent to allow the detection. These nanoparticles are perfect tools for multimodal theranostic approaches.

**Key words:** silica nanoparticles, photodynamic therapy, targeting, encapsulation, theranostic

## **Introduction**

Among the variety of nanoparticles, silica-based nanomaterials have very recently emerged as promising vectors for PDT applications[1-4]. They can also be used for other applications and particularly for biomedical imaging and theranostic[5]. Silica-based nanoparticles are indeed chemically inert and the silica matrix porosity is not susceptible to swell or change with a varying pH. A variety of precursors and methods are available for their synthesis allowing flexibility and thus meaning numerous PDT drugs can be encapsulated. Furthermore, particles size, shape, porosity and mono-dispersibility can be easily controlled during their preparation[6]. Moreover this kind of nanoparticles are especially suitable for PDT since they do not release the photosensitizer but allow O<sub>2</sub> and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> to diffuse in and out through the shell of silica nanovehicles, reducing the risk of toxicity and vascular clogging caused by free photosensitizers (PS) aggregate into clusters in blood.

### ***Non covalent encapsulation of PS in silica nanoparticles***

Following the pioneering work of Prasad and Kopelman groups[7, 8], several researchers have tried to encapsulate PS inside silica nanoparticles (Table 1). In 2003, the precursor work of Kopelman led to the encapsulation of *meta*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin or Foscan<sup>®</sup> into silica nanoparticles[8]. The same group published the encapsulation of methylene blue[9] or more recently polyacrylamide-based (PAA) nanoparticles were engineered for the

intracellular delivery of active agents. Qin *et al.* encapsulated two different methylene-blue derivatives PS in PAA nanoparticles *via* covalent linking, allowing the protection of the methylene derivatives from enzymes in the biological environment. After attachment of F3 peptide groups for targeting, each type of nanoparticle was tested *in vitro* for PDT with MDA-MB-435 tumor cells. Both kinds of nanoparticle resulted in effective tumor cell killing and did not cause dark toxicity[10]. More recently, the same team elaborated PAA nanoparticles containing HPPH (2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl-pyropheophorbide) and a cyanine dye[11]. An excellent tumor-imaging (NIR fluorescence) and phototherapeutic efficacy of the nanoconstruct formulation was demonstrated.

Most of the studies focus on the solid silica nanoparticles and few papers focused on the hollow silica nanoparticles. Due to the cavum of the hollow silica nanoparticle (HSNP), loading capacity of HSNP is higher than that of solid silica nanoparticles, which will benefit for shortening the time of the PSs reaching to the required concentration level. Deng et al. 2013 described a polyhematoporphyrin (Photosan-II) loaded into HSNP by one step wet chemical synthetic route[12]. QBC939 cells (cholangiocarcinoma) can be photodynamically damaged with PS-loaded HSNP as well as free PS but photostability, generation of singlet oxygen ( $^1O_2$ ) and therapeutic efficiency of PhotosanII were significantly improved by encapsulation into porous hollow silica nanoparticles. Moreover, Photosan-II transports into cells much more efficiently and reaches a much higher concentration. Tao et al.[13] reported a novel drug-carrier system whereby third generation (G3) polyamidoamine (PAMAM) which was successfully grafted to the surface of porous hollow silica nanoparticles followed by the attachment of gluconic acid for surface charge tuning (to tune the surface charge close to neutral which helps to prolong circulation time) and high loading of aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (AlPcS<sub>4</sub>). *In vitro* studies were performed using MCF-7 cells. An active uptake of the nanoparticles has been measured into MCF7. Indeed, high loading amount and retarded pre-release of AlPcS<sub>4</sub> have been simultaneously achieved, due to the inherent structural characteristics of the nanoparticles, and to the functionalized outer layer composed of PAMAM with a large quantity of amino groups[13]. These nanoparticles are very good singlet oxygen generator and induce significant damage to tumor cells after irradiation.

Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) which are “general recognized as safe” by the US Food and Drug Administration (FDA) have recently emerged as a promising carrier for PDT due to a large surface area, easily modified pore size and volume as well as being chemically

inert and allowing easier chemical functionalization of their surface[14]. They are one of the most representative and well-established inorganic materials, they have been promoted into biology and medicine, and shifted from extensive *in vitro* research towards preliminary *in vivo* assays in small-animal disease models (for a recent review, see[15]. In 2012, Tu *et al.* developed poly(ethylene glycol) (PEG)- and polyethylenimine (PEI)-functionalized zinc(II) phthalocyanine (ZnPc)-loaded mesoporous silica nanoparticles (MSNs), which are able to distribute in the cytosol by endolysosomal escape[14]. In this photosensitizer-carrier system (PEG-PEI-MSNs/ZnPc), ZnPc is a PDT agent; MSNs are the nanocarrier for encapsulating ZnPc; PEI facilitates endosomal escape; and PEG enhances biocompatibility. Phototoxicity of PEG-PEI-MSNs/ZnPc was greatly enhanced compared to MSNs/ZnPc. These PEG-PEI-MSNs/ZnPc nanoparticles have high tumor specificity and therapeutic efficacy *in vivo*. In 2013, Teng *et al.* described the synthesis of phospholipid-capped, protoporphyrin IX(PpIX)-loaded and FITC-sensitized MSNs nanocarriers coupled to folic acid as a targeting moiety designed for PDT[16]. As expected, the cellular uptake of the nanoPDT system was greater in folic acid receptor-overexpressed Hela cells than that of free PpIX. An *in vivo* study of subcutaneous melanoma in nude mice inoculated with B16F10 cells revealed the capability for this nanoPDT system to mitigate nearly 65% of tumor growth. Thienot *et al.* also described in 2010, one pot synthesis of hybrid versatile nanocarrier exhibiting efficient stability in biological environment[17]. These nanoparticles are made of PpIX silica-based nanocarriers with bilayer coating of triethoxyvinylsilane. One of the advantages of this synthetic strategy is that these nanocarriers may be tuned within the nanometer range from 10 nm to 200 nm by control of the temperature, reagents quantities and co-surfactant agent. The PpIX silica-based nanocarriers show efficient accumulation within tumors. The generation of  $^1\text{O}_2$  was determined chemically by bleaching of DPBF.

Li et al. 2012 suggested a new system to improve the selectivity of PDT in which pH-controllable photosensitization was achieved directly upon the interaction of cationic mesotetra(*N*-methyl-4-pyridyl)porphin(TMPyP) with bare  $\text{SiO}_2$  nanoparticles[18]. The synthesis and characterization of bare silica (4 nm in diameter) nanoparticle-attached TMPyP( $\text{SiO}_2$ -TMPyP, 6 nm in diameter) have been described for pH controllable photosensitization. Distinguished from organosilanes,  $\text{SiO}_2$  nanoparticles were functionalized as a potential quencher of triplet TMPyP and/or  $^1\text{O}_2$  at alkaline pH, thereby turning off sensitizer photoactivity. In weak acidic solutions, TMPyP was released from  $\text{SiO}_2$  surface for efficient production of  $^1\text{O}_2$ . These features make bare  $\text{SiO}_2$ -adsorbed cationic porphyrin a



promising candidate for use in PDT for cancer treatment in which efficient  $^1\text{O}_2$  production at acidic pH and sensitizer deactivation at physiological pH are desirable.  $\text{SiO}_2$ -TMPyP has the advantage of being highly dispersed in aqueous solutions and this pH-triggered therapeutic selectivity was further confirmed by MTT cytotoxicity tests and trypan blue exclusion tests of cell viability in breast cancer cell lines. Another team reported the development of  $\text{SiO}_2$ -methylene blue (MB) composite nanoparticles. By creating a radial drug concentration gradient in the nanoparticle, controllable release of MB is primarily driven by diffusion[19]. Escape of the drug molecules then triggers the  $\text{SiO}_2$  carrier decomposition, which started from the center of the nanoparticle and eventually led to its complete fragmentation. The small size of the final carrier fragments was enable their easy excretion *via* renal systems. Together with the known biocompatibility of  $\text{SiO}_2$ , the feature of controllable drug release and simultaneous carrier decomposition achieved in the  $\text{SiO}_2$ -drug nanoparticles make them promising for a wide range of diagnostic and therapeutic applications. Nevertheless, no PDT experiments were performed[19].

Two-photon absorption (TPA)-induced excitation of photosensitizers is a promising approach for increasing light penetration [20]. Qian *et al.*[21] reported organically modified silica (ORMOSIL) nanoparticles encapsulated with either PpIX or IR-820 near infrared fluorophores and showed i) direct excitation of the fluorescence of PpIX through its efficient absorption in the intracellular environment of HeLa cells (400 nm CW laser excited), ii) cytotoxicity towards tumor cells by PpIX under two-photon irradiation (800 nm fs laser excited). Moreover, they have applied IR-820 doped ORMOSIL nanoparticles for *in vivo* animal imaging. Nanoparticle can effectively target the sentinel lymph node of the mice and after intravenous injection, they can accumulate into the subcutaneously xenografted tumor through blood circulation and enhanced permeability retention (EPR) effect.

Up-conversion is another approach, in which excitation light at a longer wavelength produces emission at a shorter wavelength. This concept of photon up-converting nanoparticles (PUNPs) for PDT was first published by Zhang *et al.*[22].  $\text{NaYF}_4/\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$  nanoparticles have been used as PUNP and coated with a PS (Merocyanine 540)-encapsulating porous thin layer of silica. Recently, the team of Zhang *et al.* described sodium yttrium fluoride up-conversion nanoparticles as a carrier for zinc(II)-phthalocyanine. Mesoporous silica was coated onto  $\text{NaYF}_4$  nanocrystals to form a core-shell structure loaded with  $\text{ZnPc}$ . Upon irradiation at 980 nm, they proved that the PUNP activated the PS and showed a strong photodynamic

effect on MB49 cells[23, 24] [23, 24]. Wang and his team published pegylated NaYF<sub>4</sub> PUNP loaded with a chemotherapy molecule doxorubicin physically adsorbed and targeted by folic acid. To test whether their drug loading could be applied to PDT, they incubated the PUNP with Ce6 and TCPP and showed a loading capacity of 8.6 % (w/w) and 7.3% (w/w) respectively[25] [26]. More recently, they were the first team to demonstrate *in vivo* NIR-induced PDT based on PUNPs in animal experiments [26]. In this work, they loaded ce6 onto NaYF<sub>4</sub> based PUNP functionalized by polyethyleneglycol. Their main conclusion is that although <sup>1</sup>O<sub>2</sub> formation is more effective using direct excitation of Ce<sub>6</sub> at 660 nm than excitation at 980 nm, the PUNP offers terrifically improved tissue penetration depth and could be preferable for the treatment of large or internal tumors. A preliminary study explored a new method in tackling viral pathogens using the excitation of ZnPc\_mesoporous silica upconversion nanoparticles[27].

#### ***Covalent encapsulation of PS in silica nanoparticles***

When physically entrapped inside the silica network, the PS may be prematurely released from the carrier which can lead to a reduced efficiency of treatment and to side-effects. Covalent coupling of the PS inside or at the surface of the nanoparticles is expected to overcome these drawbacks. Well-defined mesoporous nanostructure for two-photon activated PDT have been suggested and described by Cheng et al[28]. In this original controlled pilot study, to enhance FRET efficiency and provide greater two-photon PDT efficacy, the authors designed MSN as a drug delivery system with moieties of two-photon antenna and a covalently attached photosensitizer for TPA-PDT *via* an intra-particle energy transfer mechanism(FITC as a donor and Pd-*meso*-tetra(4-carboxyphenyl) porphyrin (PdTPP) as an acceptor). The FITC absorbs and transfers its energy to PdTPP following by a second step energy transfer from the excited PdTPP to proximal oxygen molecules to produce<sup>1</sup>O<sub>2</sub>. By judicious tailoring of the donor-acceptor ratio, the well-ordered mesoporous structure of MSNs enhanced energy transfer rate up to unprecedented 93%. The induced <sup>1</sup>O<sub>2</sub> formation was demonstrated both *in vitro* and *in vivo* on breast cancer models. Moreover, further progress in the field of silica nanoparticles for PDT was achieved when multifunctional particles were functionalized by a biomolecule able to specifically target cancer cells. Active targeting represents an obvious field for improvement for PDT. Until now, most of the efforts in the development of tumor targeting-photosensitizers focused on the targeting of markers over-expressed by tumor cells themselves even if anti-vascular strategies are becoming more and more important[1, 29, 30]. For reviews see[33, 34].

Jean-Olivier Durand's team[36] described the synthesis of MSN, which covalently incorporate original water-soluble porphyrins. PDT with these MSN was performed on MDA-MB-231 breast cancer cells showing a significant photodynamic efficiency. This *in vitro* PDT effect was not only correlated with the  $^1\text{O}_2$  quantum yield but also by cellular uptake levels and subcellular localization of the nanoparticles in the organelles; The most effective pathway consists of functionalizing the surface of MSN with  $\alpha$ -mannose in order to promote an active endocytosis of the nanoparticles by cancer cells. The authors showed that the quantity of mannose on the surface should be carefully adjusted as too high an amount of mannose impairs the phototoxicity of the nanoparticles. The data demonstrated that the optimization of the different parameters of these multifunctional nanoparticles is a relevant prerequisite before their *in vivo* PDT application. They also synthesized MSN coated with poly-(L-lysine) and hyaluronic acid (HA) by using the layer-by-layer method[37], is indeed able to target cancer cells over-expressing the corresponding CD44 receptor. MSN functionalized with HA were more efficient than non-targeted MSN on HCT 116 colorectal cancer cells. The authors also demonstrated an active endocytosis mechanism involved in the uptake of MSN-HA by this cell line. More recently[38], they described the potential of non-toxic porous silicon nanoparticles (pSiNP) for the delivery of porphyrin drugs for PDT. Porphyrin molecules were covalently immobilized onto the surface of pSiNP via a new chemical modification scheme, which retains (localizes) the photoactivity of the porphyrin. Successful internalization of the porphyrin-grafted pSiNP in breast cancer cells was observed, and efficient PDT from the porphyrin-pSiNP formulation was demonstrated *in vitro*.

Rose Bengal (RB), an anionic PS was conjugated to ORMOSIL having 3-amino propyl groups by electrostatic or covalent interaction[39]. The toxicity of free RB and drug-nanoparticle complex was studied against oral (4451) and breast (MCF-7) cancer cell lines and both complexes with NPs were more cytophototoxic than free RB, with the covalent complex being the more effective. Moreover, the studies carried out cellular uptake, photostability and  $^1\text{O}_2$  formation suggest that enhanced phototoxicity is primarily due to the enhanced uptake of the RB-nanoparticle complex.

Our team described[40] the conjugation of a second generation photosensitizer, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC) and around four ATWLPPR peptide units (targeting neuropilin-1 (NRP-1), a VEGF receptor) to a hybrid gadolinium oxide nanoparticle that could be useful for magnetic resonance imaging (MRI) and PDT. Hydrodynamic diameter of the nanoparticles was comprised between 8 and 14 nm whereas the  $\text{Gd}_2\text{O}_3$  core



had a hydrodynamic diameter of 3.8 nm. Nanoparticles conferred photosensitivity on MDA-MB-231 breast cancer cells over-expressing neuropilin-1, providing evidence that TPC-grafted within the nanoparticle matrix can be photoactivated to yield photocytotoxic effects *in vitro*. For the first time, molecular affinity was tested for peptide-functionalized nanoparticles, and the presence of four peptides ligand per nanoparticle was seemingly found to lead to a positive cooperativity in binding of ATWLPPR to NRP-1 protein. In another study[42], we analyzed the influence of the number of PS grafted into the silica shell onto the photophysical properties of the nanoparticle.

Others nanoparticles were surface-functionalized with hydrophilic DOTA chelates and also used as a scaffold for the targeting peptide grafting[3]. *In vitro* investigations demonstrated the ability of these multifunctional nanoparticles to confer photosensitivity to MDA-MB-231 cancer cells (overexpressing NRP-1 receptor) related to photosensitizer concentration and light dose. Using binding test, our group also revealed the ability of peptide-functionalized nanoparticles to target NRP-1 recombinant protein. Importantly, after intravenous injection of the multifunctional nano-particles in rats bearing intracranial U87 glioblastoma, a positive MRI contrast enhancement was specifically observed in tumor tissue. Real-time MRI analysis revealed the ability of the targeting peptide to confer specific intratumoral retention of the multifunctional nanoparticles. We also validated a novel and pertinent approach for continuous monitoring and accurate quantification of the dynamics of cell response using this type of nanoparticles[2]. According to our results and as suggested by others, metabolic tests may not be adapted to measure biological effect induced by low concentrations of nanoparticles compared to the impedance-based real-time cell analysis system. The computational analysis appears as a useful tool for better understanding the dynamics of cell behavior, such as nanoparticles-cells interactions. This analysis approach provides insights for rapid and accurate evaluation of *in vitro* dynamic cell response, which may help to adequately address investigations about the nanoparticle-mediated cellular effects. For the first time, we successfully characterize the treatment response at every time point.

### ***Nanoparticles partly made with silica***

It is interesting to notice that gold nanoshell (spherical particle of approximately 120 nm core of silica upon which a thin gold shell has been deposited) is currently being used in clinical investigations of the ablation of solid tumors in head and neck and prostate cancers [43] Evaluation of their toxicity has been recently studied[44]. Fales et al. described the synthesis



of silica-coated gold nanostars for combined Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) detection and PDT[45]. It was demonstrated that the MB-loaded nanostars produce  $^1\text{O}_2$  and cytotoxic effect on BT549 breast cells upon 633 nm laser irradiation that was not seen in the silica-coated nanostars without MB. Chu et al. also elaborated Au nanorod by incorporating MB into  $\text{SiO}_2$  during Au-core/ $\text{SiO}_2$ -shell nanoparticle[46]. Upon light irradiation of the Au-core( $\text{SiO}_2$ -MB)nanoparticles, the authors showed that the generation of reactive oxygen species and the nanoparticles transport into the cytoplasm were directly responsible for significantly decreased of cell viability. They excluded the independent role of the photothermal effect and demonstrated the major role of the plasmonic effect in enhancing drug efficacy using Au-core( $\text{SiO}_2$ -MB)nanoparticles. The “spatial vicinity” required for Au and the PS, and the “energy match” between PS absorption and Au surface plasmon resonance are two critical factors to enable the plasmonic effect, which leads to enhanced drug efficacy.

Coating nanoparticles with silica using tetraethoxysilane in the presence of ammonia has been widely used to improve the dispersion and the cell compatibility of various nanoparticles in a physical environment. The resultant nanoparticles consist of a core made of the base nanoparticles and a shell made of silica, therefore known as a core-shell structure. Preliminary study (chemistry and photophysics) with potential applications in PDT has been performed by ulatowska-jarza with Ag-doped silica nanoparticles[47]. Recently, Feng et al.[48] presented their investigations regarding the influence of the silica coating on the photoreactivity, the cytotoxicity and the photo-killing ability of  $\text{TiO}_2$  nanoparticle. The presence of a silica shell has improved the compatibility of  $\text{TiO}_2$  with L929 cells whereas reduced photocatalytic reactivity was also evidenced. This was compensated for the improved cell compatibility. When the silica shell thickness was controlled to a minimum (5.5 nm) the photocatalytic reactivity of coated  $\text{TiO}_2$  was very closed to that of non-coated  $\text{TiO}_2$ . A photo-theranostic agent based on chlorin e6-conjugated silica-coated gold nanocluster ( $\text{AuNCs}@\text{SiO}_2\text{-Ce6}$ ) was designed and prepared by for fluorescence imaging-guided PDT[49].

Table 1: Silica-based nanoparticles for PDT applications

Type of nanoparticles	Diameter size (nm)	Type of photosensitizer(PS)	PS coupling	Cell lines	Reference
Silica	180	mTHPC	E	-	[8]
	30	HPPH	E	UCI-107, human epithelial ovarian carcinoma, Hela	[7]
	160	MB	E	C6 (rat glioma)	[9]
	10	fullerene	C	-	[50]

	30	HPPH+BDSA	E	human malignant cervical cells (Hela)	[51]
	25	HPPH	E	-	[52]
	20	IP	C	colon 26	[53, 54]
	130	Hypocrellin A	E	human malignant cervical cells (Hela)	[55, 56]
	55-90	PpIX	C	-	[57]
	25	PPIX	E	human malignant cervical cells (Hela)	[58]
	30	mTHPC	E	human oesophageal cancer cells KYSE 510	[59, 60]
	25-30	Pc4	E	melanoma cells (A-375 and B16-F10)	[61]
	60	Two-photon absorption PS	E	macrophages	[62]
	105	Methylene blue	E	human malignant cervical cells (Hela) + balb/c nude mice	[63]
	110	PpIX	C	human malignant cervical cells (Hela)	[64]
	70-100	PdTPP	C	breast cancer cell line (MDA-MB-231), glioblastoma cells (U87-MG)	[65]
	160	Anionic porphyrin	C	MDA-MB-231 breast cancer cell line	[66, 67]
	57	hematoporphyrin	C	HO-8910 PM cells	[68]
	10, 25, 60	PpIX	E	colon cancer cell line (HCT 116) and HT29, A431, LLBC37, MDA-MB-231	[69]
	110	Hypocrellin A	E	human malignant cervical cells (Hela)	[70, 71]
	100	Hypocrellin B	E	breast cancer cell line (MCF-7)	[72]
	50-80	Rose bengal	C	Staphylococcus aureus (MRSA) and Staphylococcus epidermis.	[23]
	78 150	porphyrin	C	breast cancer cell line (MDA MB 231)	[36]
	273	porphyrin	C	Human colorectal HCT 116 cancer cells	[37]
	nd	ZnPc	E	Mouse ascetic hepatoma cell line H22 and <i>in vivo</i>	[14]
	6	meso tetra( N-methyl-4-pyridyl)porphine	E	SK-BR-3 cells	[18]
	80	MB	E	-	[19]
	40	MB	E	HepG2 cells	[46]
	50	TPP	E	-	[73, 74]
	10-200	PpIX	E	HCT 116 (colon cancer line)	[17, 75]
	8-14	TPC	C	MDA-MB-231 breast cancer cell line	[40, 41]
	25	PpIX	E	Hela cell and <i>in vivo</i>	[21]
	158	PdTPP	C	MDA-MB-231 breast cancer cell line and <i>in vivo</i>	[28]
	5	TPC	C	Human lung carcinoma H1299 cell line	[42]
	5	TPC	C	MDA-MB-231 breast cancer cell line	[2]
	4.6	TPC	C	MDA-MB-231 breast cancer cell line <i>in vitro</i> and U87 <i>in vivo</i>	[3]
Hollow silica	25-90	Photosan-II	E	Human cholangiocarcinoma QBC 939	[12]
	100-200	AlPcS4	E	breast cancer cells lines (MCF-7)	[13]
	nd	PpIX	E	Hela cells <i>in vitro</i> and B16F10 cells <i>in vivo</i>	[16]
	35-50	RB	E/C	Squamous carcinoma 4451 cell lines, MCF-7	[39]
	nd	MB	E	BT549 breast cancer cells	[45]
Porous silica	35-245	porphyrin	C	breast cancer cell line (MCF 7)	[38]
Silica	60 - 120	merocyanin	E	breast cancer cells lines (MCF-7/AZ)	[22]
NaYF <sub>4</sub> /Yb <sup>3+</sup> , Er <sup>3+</sup>	30	HPPH-BDSA	E	human malignant cervical cells (Hela)	[52]
	35-60	ZnPc	E	bladder cancer cell lines (MB49)	[23, 24]
	30	Chlorin e6 TCPP	E	-	[48, 76]
	30	chlorin e6	C	Hela cells 4T1 murine	[26, 76]

Coated by silica TiO <sub>2</sub>	35 to 46	TiO <sub>2</sub>	C	Primary adherent mouse fibroblast connective tissue cells (L929)	[48]
Coated by silica Gold nanocluster	68	chlorin e6	C	In vitro and in vivo: MDA-MB-235	[49]

Abbreviations. Size: hydrodynamic diameter in nm; PS: photosensitizer; C/E: C covalently coupled, E encapsulated; AlPcS4: aluminum phthalocyanines tetrasulfonate; BDSA: 9,10-bis [4'-(4''-Aminostyryl)styryl]-anthracene; HPPH: 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl-pyropheophorbide; IP: iodobenzylpyropheophorbide; MB, methylene blue; mTHPC: *meta*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin; PpIX: Protoporphyrin IX; PdTPP: Pd-*meso*-tetra(4-carboxyphenyl) porphyrin; TPC: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin; RB, rose Bengal; TCPP: *meso*-tetra(4-carboxyphenyl)porphine; TPC: Tetraphenylmonocarboxylicchlorin; TPP: *meso*-tetraphenylporphyrin; ZnPc: Zinc(II) phthalocyanine; "": not specified.

## Conclusion

In this chapter, we summarize the latest progress on designing silica-based nanoparticles for PDT applications. Silica-based-nanoparticles are attracting a great deal of attention for various theranostic applications. Compared to others nanoparticles, they possess several potential advantages to improve *in vivo* selectivity and to enhance targeting efficiency. Silica-based nanoprobe can be engineered to achieve longer blood circulation times, specific clearance pathways, and multivalent binding. The synthesis of mesoporous silica-based nanoparticles lead to different approaches used for surface functionalization. Future applications will be focused on the potential applications of silica-based nanoparticles in optical, magnetic resonance, and multimodal imaging associated with PDT.

## References

1. Bechet, D.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Viriot, M.L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents *Trends Biotechnol.*, **2008**, *26*, (11), 612-621
2. Benachour, H.; Bastogne, T.; Toussaint, M.; Chemli, Y.; Seve, A.; Frochot, C.; Lux, F.; Tillement, O.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M. Real-Time Monitoring of Photocytotoxicity in Nanoparticles-Based Photodynamic Therapy: A Model-Based Approach *Plos One*, **2012**, *7*, (11)
3. Benachour, H.; Seve, A.; Bastogne, T.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Jasniewski, J.; Miladi, I.; Billotey, C.; Tillement, O.; Lux, F.; Barberi-Heyob, M. Multifunctional Peptide-Conjugated Hybrid Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy and MRI *Theranostics*, **2012**, *2*, (9), 889-904
4. Chouikrat, R.; Seve, A.; Vanderesse, R.; Benachour, H.; Barberi-Heyob, M.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.O.; Verelst, M.; Frochot, C. Non Polymeric Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications: Recent Developments *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*, (6), 781-792
5. Vivero-Escoto, J.L.; Huxford-Phillips, R.C.; Lin, W.B. Silica-based nanoprobe for biomedical imaging and theranostic applications *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, (7), 2673-2685
6. Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochot, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.O. Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications *Nanoscale*, **2010**, *2*, (7), 1083-1095
7. Roy, I.; Ohulchanskyy, T.Y.; Pudavar, H.E.; Bergey, E.J.; Oseroff, A.R.; Morgan, J.; Dougherty, T.J.; Prasad, P.N. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, (26), 7860-7865

8. Yan, F.; Kopelman, R. The Embedding of Meta-tetra(Hydroxyphenyl)-Chlorin into Silica Nanoparticle Platforms for Photodynamic Therapy and Their Singlet Oxygen Production and pH-dependent Optical Properties *Photochem. Photobiol.*, **2003**, *78*, (6), 587-591
9. Tang, W.; Xu, H.; Kopelman, R.; Philbert, M.A. Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms *Photochem. Photobiol.*, **2005**, *81*, (2), 242-249
10. Wenger, Y.; Schneider, R.J.; Reddy, G.R.; Kopelman, R.; Jolliet, O.; Philbert, M.A. Tissue distribution and pharmacokinetics of stable polyacrylamide nanoparticles following intravenous injection in the rat *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2011**, *251*, (3), 181-190
11. Gupta, A.; Wang, S.; Pera, P.; Rao, K.; Patel, N.; Ohulchanskyy, T.Y.; Missert, J.; Morgan, J.; Koo-Lee, Y.R.; Kopelman, R.; Pandey, R.K. Multifunctional nanoplatfoms for fluorescence imaging and photodynamic therapy developed by post-loading photosensitizer and fluorophore to polyacrylamide nanoparticles *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, **2012**, *8*, 941-950
12. Deng, X.; Xiong, L.; Lin, L.; Xiong, G.; Miao, X. Photosan-II loaded hollow silica nanoparticles: Preparation and its effect in killing for QBC939 cells *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, **2013**
13. Tao, X.; Yang, Y.J.; Liu, S.; Zheng, Y.Z.; Fu, J.; Chen, J.F. Poly(amidoamine) dendrimer-grafted porous hollow silica nanoparticles for enhanced intracellular photodynamic therapy *Acta Biomater.*, **2013**, *9*, (5), 6431-6438
14. Tu, J.; Wang, T.X.; Shi, W.; Wu, G.S.; Tian, X.H.; Wang, Y.H.; Ge, D.T.; Ren, L. Multifunctional ZnPc-loaded mesoporous silica nanoparticles for enhancement of photodynamic therapy efficacy by endolysosomal escape *Biomaterials*, **2012**, *33*, (31), 7903-7914
15. Chen, Y.; Chen, H.R.; Shi, J.L. In Vivo Bio-Safety Evaluations and Diagnostic/Therapeutic Applications of Chemically Designed Mesoporous Silica Nanoparticles *Adv. Mater.*, **2013**, *25*, (23), 3144-3176
16. Teng, I.T.; Chang, Y.J.; Wang, L.S.; Lu, H.Y.; Wu, L.C.; Yang, C.M.; Chiu, C.C.; Yang, C.H.; Hsu, S.L.; Ho, J.A. Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials*, **2013**, *34*, (10), 7462-7747
17. Thienot, E.; Germain, M.; Piejos, K.; Simon, V.; Darmon, A.; Marill, J.; Borghi, E.; Levy, L.; Hochepeid, J.F.; Pottier, A. One pot synthesis of new hybrid versatile nanocarrier exhibiting efficient stability in biological environment for use in photodynamic therapy *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2010**, *100*, (1), 1-9
18. Li, W.B.; Lu, W.T.; Fan, Z.; Zhu, X.C.; Reed, A.; Newton, B.; Zhang, Y.Z.; Courtney, S.; Tiyyagura, P.T.; Ratcliff, R.R.; Li, S.F.; Butler, E.; Yu, H.T.; Ray, P.C.; Gao, R.M. Enhanced photodynamic selectivity of nano-silica-attached porphyrins against breast cancer cells *J. Mater. Chem.*, **2012**, *22*, (25), 12701-12708
19. Zhang, S.L.; Chu, Z.Q.; Yin, C.; Zhang, C.Y.; Lin, G.; Li, Q. Controllable Drug Release and Simultaneously Carrier Decomposition of SiO<sub>2</sub>-Drug Composite Nanoparticles *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, (15), 5709-5716
20. Gallavardin, T.; Maurin, M.; Marotte, S.; Simon, T.; Gabudean, A.M.; Bretonnière, Y.; Lindgren, M.; Lerouge, F.; Baldeck, P.L.; Stéphan, O.; Leverrier, Y.; Marvel, J.; Parola, S.; Maury, O.; Andraud, C. Photodynamic therapy and two-photon bio-imaging applications of hydrophobic chromophores through amphiphilic polymer delivery *Photochemical and Photobiological Sciences*, **2010**, *10*, (7), 1216-1225
21. Qian, J.; Wang, D.; Cai, F.H.; Zhan, Q.Q.; Wang, Y.L.; He, S.L. Photosensitizer encapsulated organically modified silica nanoparticles for direct two-photon photodynamic therapy and In Vivo functional imaging *Biomaterials*, **2012**, *33*, (19), 4851-4860
22. Zhang, P.; Steelant, W.; Kumar, M.; Scholfield, M. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, (15), 4526-4527
23. Guo, H.; Qian, H.; Idris, N.M.; Zhang, Y. Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer *Nanomedicine* **2010**, *6*, (3), 486-495

24. Qian, H.S.; Guo, H.C.; Ho, P.C.L.; Mahendran, R.; Zhang, Y. Mesoporous-silica-coated up-conversion fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy *Small*, **2009**, *5*, (20), 2285-2290
25. Wang, C.; Tao, H.Q.; Cheng, L.; Liu, Z. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles *Biomaterials*, **2011**, *32*, (26), 6145-6154
26. Wang, C.; Tao, H.; Cheng, L.; Liu, Z. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles *Biomaterials*, **2011**, *32*, (26), 6145-6154
27. Lim, M.E.; Zhang, Y.; Chu, J.J.H. In *Colloidal Nanocrystals for Biomedical Applications VII*, **2012**; Vol. 8232.
28. Cheng, S.H.; Hsieh, C.C.; Chen, N.T.; Chu, C.H.; Huang, C.M.; Chou, P.T.; Tseng, F.G.; Yang, C.S.; Mou, C.Y.; Lo, L.W. Well-defined mesoporous nanostructure modulates three-dimensional interface energy transfer for two-photon activated photodynamic therapy *Nano Today*, **2011**, *6*, (6), 552-563
29. Taquet, J.P.; Frochot, C.; Manneville, V.; Barberi-Heyob, M. Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, (15), 1673-1687
30. Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M.-L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells *J. Controlled Release*, **2006**, *111*, (1-2), 153-164
31. Bechet, D.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Viriot, M.L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents *Trends Biotechnol.*, **2008**, *26*, (11), 612-621
32. Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M.L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells *J. Controlled Release*, **2006**, *111*, (1-2), 153-164
33. Benachour, A.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. In *Brain cancer, targeting strategies and cervical cancer*; Nova Publishers: New York, **2011**, pp 738-753.
34. Kamarulzaman, E.E.; Benachour, H.; Barberi-Heyob, M.; Frochot, C.; Wahab, H.A.; Guillemin, F.; Vanderesse, R. In *Advances in Cancer Therapy* Gali-Mohtaseb, Ed.; Intech: New York, **2011**; Vol. 3.
35. Kamarulzaman, E.E.; Benachour, H.; Barberi-Heyob, M.; Frochot, C.; Wahab, H.A.; Guillemin, F.; Vanderesse, R. In *Advances in Cancer Therapy*. Gali-Mohtaseb, Ed.; InTech: New York, **2011**; Vol. 3.
36. Hocine, O.; Gary-Bobo, M.; Brevet, D.; Maynadier, M.; Fontanel, S.; Raehm, L.; Richeter, S.; Loock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Charnay, C.; Derrien, G.; Smaïhi, M.; Sahmoune, A.; Morère, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.O. Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles for photodynamic therapy *Int. J. Pharm.*, **2010**, *402*, (1-2), 221-230
37. Gary-Bobo, M.; Brevet, D.; Benkirane-Jessel, N.; Raehm, L.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.O. Hyaluronic acid-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient photodynamic therapy of cancer cells *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2012**, *9*, (3), 256-260
38. Secret, E.; Maynadier, M.; Gallud, A.; Gary-Bobo, M.; Chaix, A.; Belamie, E.; Maillard, P.; Sailor, M.J.; Garcia, M.; Durand, J.O.; Cunin, F. Anionic porphyrin-grafted porous silicon nanoparticles for photodynamic therapy *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, (39), 4202-4204
39. Uppal, A.; Jain, B.; Gupta, P.K.; Das, K. Photodynamic Action of Rose Bengal Silica Nanoparticle Complex on Breast and Oral Cancer Cell Lines *Photochem. Photobiol.*, **2011**, *87*, (5), 1146-1151
40. Couleaud, P.; Bechet, D.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M.; Faure, A.C.; Roux, S.; Tillement, O.; Porhel, S.; Guillemin, F.; Frochot, C. Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy *Nanomedicine*, **2011**, *6*, (6), 995-1009
41. Couleaud, P.; Bechet, D.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M.; Faure, A.C.; Roux, S.; Tillement, O.; Porhel, S.; Guillemin, F.; Frochot, C. Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanomedicine*, **2011**, DOI:10.2217/NNM.11.31.
42. Seve, A.; Couleaud, P.; Lux, F.; Tillement, O.; Arnoux, P.; Andre, J.C.; Frochot, C. Long-distance energy transfer photosensitizers arising in hybrid nanoparticles leading to fluorescence emission and



- singlet oxygen luminescence quenching *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2012**, *11*, (5), 803-811
43. Erickson, T.A.; Tunnell, J.W. In *Mixed Metal Nanomaterials*. Challa, S.S.R., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **2009**; Vol. 3.
  44. Shayne, M.; Quill, T.E. Oncologists Responding to Grief *Arch. Intern. Med.*, **2012**, *172*, (12), 966-967
  45. Fales, A.M.; Yuan, H.; Vo-Dinh, T. Silica-Coated Gold Nanostars for Combined Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Detection and Singlet-Oxygen Generation: A Potential Nanoplatform for Theranostics *Langmuir*, **2011**, *27*, (19), 12186-12190
  46. Chu, Z.; Yin, C.; Zhang, S.; Lin, G.; Li, Q. Surface plasmon enhanced drug efficacy using core-shell Au@SiO<sub>2</sub> nanoparticle carrier *Nanoscale*, **2013**, *5*, (8), 3406-3411
  47. Ulatowska-Jarza, A.; Pucinska, J.; Wysocka-Krol, K.; Holowacz, I.; Podbielska, H. Nanotechnology for biomedical applications - enhancement of photodynamic activity by nanomaterials *Bulletin of the Polish Academy of Sciences-Technical Sciences*, **2011**, *59*, (3), 253-261
  48. Feng, X.H.; Zhang, S.K.; Lou, X. Controlling silica coating thickness on TiO<sub>2</sub> nanoparticles for effective photodynamic therapy *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **2013**, *107*, 220-226
  49. Huang, P.; Lin, J.; Wang, S.J.; Zhou, Z.J.; Li, Z.M.; Wang, Z.; Zhang, C.L.; Yue, X.Y.; Niu, G.; Yang, M.; Cui, D.X.; Chen, X.Y. Photosensitizer-conjugated silica-coated gold nanoclusters for fluorescence imaging-guided photodynamic therapy *Biomaterials*, **2013**, *34*, (19), 4643-4654
  50. Davydenko, M.O.; Radchenko, E.O.; Yashchuk, V.M.; Dmitruk, I.M.; Prylutsky, Y.I.; Matishevskaya, O.P.; Golub, A.A. Sensibilization of fullerene C60 immobilized at silica nanoparticles for cancer photodynamic therapy *J. Mol. Liq.*, **2006**, *127*, (1-3), 145-147
  51. Gao, D.; Agayan, R.R.; Xu, H.; Philbert, M.A.; Kopelman, R. Nanoparticles for two-photon photodynamic therapy in living cells *Nano Lett.*, **2006**, *6*, (11), 2383-2386
  52. Kim, S.; Ohulchanskyy, T.Y.; Pudavar, H.E.; Pandey, R.K.; Prasad, P.N. Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, (9), 2669-2675
  53. Ohulchanskyy, T.Y.; Roy, I.; Goswami, L.N.; Chen, Y.; Bergey, E.J.; Pandey, R.K.; Oseroff, A.R.; Prasad, P.N. Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer *Nano Lett.*, **2007**, *7*, (9), 2835-2842
  54. Ohulchanskyy, T.Y.; Roy, I.; Goswami, L.N.; Chen, Y.; Bergey, E.J.; Pandey, R.K.; Oseroff, A.R.; Prasad, P.N. Optically and Magnetically Doped Organically Modified Silica Nanoparticles as Efficient Magnetically Guided Biomarkers for Two-Photon Imaging of Live Cancer Cells *Nano Lett.*, **2007**, *7*, (9), 2835-2842
  55. Zhou, J.; Zhou, L.; Dong, C.; Feng, Y.; Wei, S.; Shen, J.; Wang, X. Preparation and photodynamic properties of water-soluble hypocrellin A-silica nanospheres *Mater. Lett.*, **2008**, *62*, (17-18), 2910-2913
  56. Zhou, L.; Liu, J.H.; Zhang, J.; Wei, S.H.; Feng, Y.Y.; Zhou, J.H.; Yu, B.Y.; Shen, J. A new sol-gel silica nanovehicle preparation for photodynamic therapy in vitro *Int. J. Pharm.*, **2010**, *386*, (1-2), 131-137
  57. Rossi, L.M.; Silva, P.R.; Vono, L.L.R.; Fernandes, A.U.; Tada, D.B.; Baptista, M.S. Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: Preparation, optical properties and singlet oxygen generation *Langmuir*, **2008**, *24*, (21), 12534-12538
  58. Qian, J.; Gharibi, A.; He, S. Colloidal mesoporous silica nanoparticles with protoporphyrin IX encapsulated for photodynamic therapy *Journal of biomedical optics*, **2009**, *14*, (1), 014012
  59. Compagnin, C.; Ba, L.; Mognato, M.; Celotti, L.; Miotto, G.; Arduini, M.; Moret, F.; Fede, C.; Selvestrel, F.; Echevarria, I.M.R.; Mancin, F.; Reddi, E. The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins *Nanotechnology*, **2009**, *20*, (34)
  60. Compagnin, C.; Bau, L.; Mognato, M.; Celotti, L.; Miotto, G.; Arduini, M.; Moret, F.; Fede, C.; Selvestrel, F.; Echevarria, I.M.R.; Mancin, F.; Reddi, E. The cellular uptake of meta-tetra

- (hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins *Nanotechnology*, **2009**, *20*, (34)
61. Zhao, B.; Yin, J.J.; Bilski, P.J.; Chignell, C.F.; Roberts, J.E.; He, Y.Y. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2009**, *241*, (2), 163-172
  62. Velusamy, M.; Shen, J.Y.; Lin, J.T.; Lin, Y.C.; Hsieh, C.C.; Lai, C.H.; Lai, C.W.; Ho, M.L.; Chen, Y.C.; Chou, P.T.; Hsiao, J.K. A new series of quadrupolar type two-photon absorption chromophores bearing 11, 12-dibutoxydibenzo[a,c]-phenazine bridged amines; their applications in two-photon fluorescence imaging and two-photon photodynamic therapy *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, *19*, (15), 2388-2397
  63. He, X.; Wu, X.; Wang, K.; Shi, B.; Hai, L. Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous in vivo imaging and photodynamic therapy *Biomaterials*, **2009**, *30*, (29), 5601-5609
  64. Tu, H.L.; Lin, Y.S.; Lin, H.Y.; Hung, Y.; Lo, L.W.; Chen, Y.F.; Mou, C.Y. In vitro studies of functionalized mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy *Adv. Mater.*, **2009**, *21*, (2), 172-177
  65. Cheng, S.H.; Lee, C.H.; Yang, C.S.; Tseng, F.G.; Mou, C.Y.; Lo, L.W. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with an oxygen-sensing probe for cell photodynamic therapy: Potential cancer theranostics *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, (9), 1252-1257
  66. Brevet, D.; Gary-Bobo, M.; Raehm, L.; Richeter, S.; Hocine, O.; Amro, K.; Loock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Morère, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.O. Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy *Chem. Commun.*, **2009**, (12), 1475-1477
  67. Brevet, D.; Gary-Bobo, M.; Raehm, L.; Richeter, S.; Hocine, O.; Amro, K.; Loock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Morere, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.O. Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy *Chem Commun (Camb)*, **2009**, (12), 1475-1477
  68. Zhang, R.; Wu, C.; Tong, L.; Tang, B.; Xu, Q.H. Multifunctional core-shell nanoparticles as highly efficient imaging and photosensitizing agents *Langmuir*, **2009**, *25*, (17), 10153-10158
  69. Simon, V.; Devaux, C.; Darmon, A.; Donnet, T.; Thienot, E.; Germain, M.; Honnorat, J.; Duval, A.; Pottier, A.; Borghi, E.; Levy, L.; Marill, J. Pp IX silica nanoparticles demonstrate differential interactions with in vitro tumor cell lines and in vivo mouse models of human cancers *Photochem. Photobiol.*, **2010**, *86*, (1), 213-222
  70. Zhou, L.; Wang, W.; Feng, Y.; Wei, S.; Zhou, J.; Yu, B.; Shen, J. Delivering a hydrophobic anticancer drug for photodynamic therapy by amorphous formulation *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, (21), 6172-6174
  71. Zhou, L.; Wang, W.; Feng, Y.Y.; Wei, S.H.; Zhou, J.H.; Yu, B.Y.; Shen, J.A. Delivering a hydrophobic anticancer drug for photodynamic therapy by amorphous formulation *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, (21), 6172-6174
  72. Yang, Y.; Song, W.; Wang, A.; Zhu, P.; Fei, J.; Li, J. Lipid coated mesoporous silica nanoparticles as photosensitive drug carriers *PCCP*, **2010**, *12*, (17), 4418-4422
  73. Li, Z.; Wang, J.; Chen, J.; Lei, W.; Wang, X.; Zhang, B. pH-responsive silica nanoparticles for controllable <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generation *Nanotechnology*, **2010**, *21*, (11), 115102/115101-115102/115106
  74. Li, Z.B.; Wang, J.G.; Chen, J.R.; Lei, W.H.; Wang, X.S.; Zhang, B.W. pH-responsive silica nanoparticles for controllable O-1(2) generation *Nanotechnology*, **2010**, *21*, (11)
  75. Thienot, E.; Germain, M.; Piejos, K.; Simon, V.; Darmon, A.; Marill, J.; Borghi, E.; Levy, L.; Hochepped, J.F.; Pottier, A. One pot synthesis of new hybrid versatile nanocarrier exhibiting efficient stability in biological environment for use in photodynamic therapy *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, **2010**, *100*, (1), 1-9
  76. Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z. Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy *Biomaterials*, **2011**, *32*, (4), 1110-1120



## **I. 5. d. Les photosensibilisateurs de quatrième génération pour le théranostic**

Le théranostic est l'association d'une thérapeutique et d'un test diagnostique. Le développement de nanoparticules adressées, permettant un traitement par PDT et une visualisation de la tumeur par IRM est en plein essor.

## **I. 5. e. L'IRM**

### **I. 5. e. i. Généralités**

L'IRM est l'une des modalités la plus prometteuse pour le théranostic du fait de sa capacité d'imagerie. Ce mode d'imagerie est sans conséquence sur la santé du patient et elle permet d'avoir une image en trois dimensions ce qui fait qu'elle est utilisée couramment dans le cadre de la détection de cancers et de maladies cardiovasculaires. Cette technique offre de nombreux avantages qui sont notamment sa haute résolution spatiale son innocuité, sa capacité accrue de contraste anatomique qui permet de différencier les tissus et l'utilisation d'un rayonnement non ionisant<sup>[207]</sup>. L'imagerie IRM est utilisée dans le milieu hospitalier partout dans le monde depuis 1985 après avoir reçu une autorisation de la FDA. Cette technique joue actuellement un rôle important en oncologie clinique. L'obtention d'un signal en imagerie IRM est basée sur l'observation des mouvements de précession de protons de l'eau suite à l'application d'un champ magnétique. Les mouvements des protons sont liés à plusieurs constantes ( $\tau_D$ ,  $\tau_R$ ,  $\tau_M$ ,  $T_{1e}$ ) qui caractérisent le chélate formé par l'agent chélatant et l'ion métallique<sup>[332]</sup> (Figure 111). Après application de fréquences radio pulsées, le retour à l'état fondamental aligné des protons lors du processus de relaxation est exploité afin d'obtenir une image. Durant cette étape les lésions apparaissent clairement à l'image par résonance magnétique. Cependant ce procédé montre des limites de sensibilité d'image du fait du contraste insuffisant entre un tissu normal et un tissu tumoral qui résulte d'une faible différence structurale entre ces deux types de tissus<sup>[207]</sup>. Ainsi, pour contourner cette limite les agents de contrastes ont été utilisés pour augmenter le contraste de signal entre les tissus tumoraux et les tissus sains. Pour obtenir cet effet, il est possible d'utiliser des nanoparticules. Elles sont capables de réduire le temps de relaxation longitudinal du fait de leur gros moment magnétique (à cause des 7 électrons non-appariés)<sup>[332]</sup> et du temps de relaxation de spin de leurs électrons relativement long ( $10^{-9}$  s) des ions  $Gd^{3+}$  exposés à un champ magnétique<sup>[207]</sup>. Les intérêts de l'imagerie multimodalité sont multiples.

Chaque mode d'imagerie a ses propres avantages et inconvénients : l'IRM a une résolution spatiale de 25 à 100  $\mu m$  mais une faible sensibilité (de la millimole à la micromole par litre). Les radioisotopes ont une excellente sensibilité de l'ordre du picomole par litre mais une faible résolution allant de 1 à 2 mm. Les QD quant à eux ont une bonne sensibilité (nanomole à picomole par litre) mais une très faible pénétration dans les tissus, de l'ordre du centimètre, avec une résolution moyenne *in vivo* de 2 à 3 mm mais une excellente résolution *in vitro* (inframicrométrique). Les sondes multimodales peuvent être transformées en agents thérapeutiques par l'encapsulation d'un principe actif ou d'un gène, ce qui permet la visualisation de la biodistribution et/ou l'effet de la substance et donc le théranostic.

Il existe deux types d'agents de contraste pour l'IRM : les agents de contraste négatif (nanoparticules SPIO) et les agents de contraste positif (chélates de métaux paramagnétiques)<sup>[207]</sup>. Les premiers donnent une image en noir (assombrie) lorsqu'ils sont placés sous influence d'un champ magnétique, les seconds éclaircissent l'image<sup>[207]</sup>.

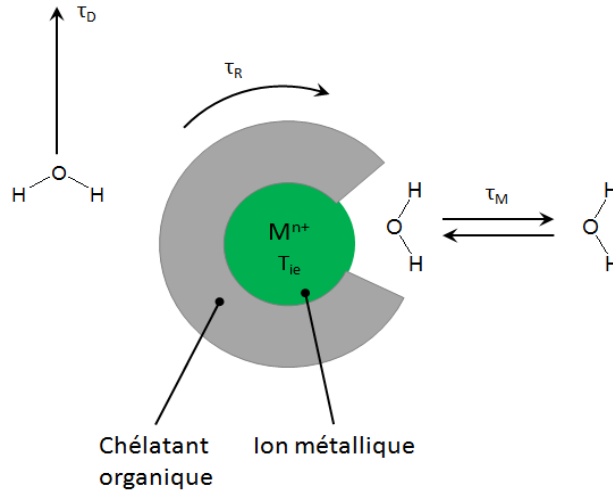


Figure 111 : Schéma d'un chélate pour l'imagerie IRM et des différentes constantes associées, d'après la référence [332].

$T_{ie}$  = Temps de relaxation électronique du cation métallique

$\tau_D$  = Temps de corrélation translationnel ( temps de diffusion d'une molécule d'eau)

$\tau_R$  = Temps de corrélation rotationnel

$\tau_M$  = Temps de résidence de coordination de la molécule d'eau dans le chélate

### I. 5. e. ii. Ions Gd<sup>3+</sup> et toxicité

Les ions trivalents Gd(III) ont une taille proche des ions Ca(II) ce qui permet aux ions Gd<sup>3+</sup> de remplacer les ions calcium dans les processus physiologiques calcio-dépendants. De plus, l'accumulation de ces ions toxiques dans l'organisme conduit à une désorganisation de la biodistribution et de l'activité des ions calcium ainsi que les processus biologiques dans lesquels le calcium joue un rôle clé [207]. Pour remédier à cela, des complexes de gadolinium ont donc été développés pour annuler les effets délétères de ce métal (ex : Gd-DTPA). Cependant, du fait de leur faible masse moléculaire (500 Da), les chélates de gadolinium sont rapidement évacués de la circulation sanguine ce qui réduit fortement leurs temps d'utilisation pour le diagnostic après injection [207]. En IRM, la relaxation longitudinale (T1) via un agent de contraste possède de gros avantages par rapport à la relaxation transversale (T2) obtenue avec les agents de contraste négatif, tels qu'une forte augmentation du signal et une homogénéité magnétique sans perturbation du champ magnétique [311] (mesure du niveau de relaxation magnétique nucléaire des protons de l'eau, longitudinal (r1) et transversal (r2) ) [311]. La propriété paramagnétique des ions Gd<sup>3+</sup> vient de ses 7 électrons non appariés qui permettent d'avoir une relaxation effective en T1 des molécules d'eau environnantes, une propriété requise pour les agents de contraste positif [311]. Le temps de relaxation T1 des protons à proximité de matériaux paramagnétiques décroît avec l'augmentation du signal positif [311]. Ainsi, plus il y a de gadolinium à proximité des molécules d'eau plus les moments magnétiques seront fortement retenus et plus la relaxation des protons de l'eau sera efficace. Une valeur faible du rapport r2/r1 est nécessaire pour avoir un bon agent de contraste T1 [311]. Plus la fraction molaire de protons provenant de l'eau interagissant avec les Gd est grande et plus l'augmentation de relaxation de ces molécules est grande [207]. Les agents de contraste basés sur des composés de gadolinium agissent par réduction du temps de relaxation des protons de l'eau ce qui affecte la relaxation longitudinale r1 (mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>). La relaxation longitudinale des protons de l'eau en solution aqueuse augmente avec le temps de fluctuation du couplage dipolaire entre le moment magnétique des électrons de l'ion métallique et le moment magnétique nucléaire des protons du solvant. Les interactions dipolaires impliquent que les molécules d'eau qui sont dans la sphère de coordination du métal et

qu'elles ne sont pas directement couplées au centre paramagnétique mais qu'elles diffusent à l'extérieur du complexe ou qu'elles se trouvent liées à l'ion métallique par des liaisons hydrogène avec les groupes polaires du ligand <sup>[207]</sup>. Ceci a conduit au développement et à l'utilisation d'un grand nombre de chélates de Gd<sup>3+</sup> en temps qu'agent de contraste T1. Cependant, les chélates de gadolinium (Tableau 7) présentent des inconvénients tels que la toxicité possible des ions Gd<sup>3+</sup> relargués, la quantité limitée d'ions paramagnétiques peu recommandée pour l'imagerie de ciblage et leur stagnation dans les espaces extracellulaires tels que les vaisseaux sanguins. Ceci conduit à la nécessité de développer des nanoparticules en temps qu'agent de contraste de type T1 <sup>[311]</sup>.

**Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différents agents de contraste mis sur le marché, adapté de la référence [114].**

Nom commercial	Structure	Classification	Cible	Firme commerciale
Magnevist®	Gd-DTPA	Agent T1	Extracellulaire	Schering
Eovist®	Gd-EOB-DTPA, Gadoxetate	Agent T1	Spécifique au foie	Schering
OptiMARK®	Gd-DTPA-BMEA	Agent T1	Extracellulaire	Mallinckrodt
Dotarem®	Gd-DOTA	Agent T1	Extracellulaire	Guerbet
Gadovist®	Gd-DO3A-Butriol	Agent T1	Extracellulaire	Schering
ProHance®	Gd-DO3A-HP	Agent T1	Extracellulaire	Bracco
Omniscan®	Gd-DTPA-BMA	Agent T1	Extracellulaire	Nycomed
MultiHance®	Gd-BOPTA, Gadobenate	Agent T1	Spécifique au foie	Bracco
Teslascan®	Mn-DPDP, Mangafodipir	Agent T1	Spécifique au foie	Amersham
Feridex®	Particules d'oxyde de fer, Ferumoxide	Agent T2	Spécifique au foie	Berlex
Endorem®	Particules d'oxyde de fer	Agent T2	Spécifique au foie	Guerbet
Resovist®	Nanoparticules d'oxyde de fer enrobées avec du carboxyldextrane	Agent T2	Spécifique au foie	Schering



*Vers une nanoparticule idéale*



# II. Vers une nanoparticule idéale

## II. 1. Contexte

La première approche réalisée pendant la thèse de Pierre Couleaud a consisté à étudier une nanoparticule, nommée « *Nanostar* », afin de prouver *in vivo* la possibilité de combiner la PDT et l'imagerie IRM grâce à l'utilisation d'une même nanoparticule. Cette étude a été la base de la mise en place de la méthodologie du plan d'expérience réalisé dans cette thèse dans le but d'obtenir une nanoparticule dite « idéale » permettant de combiner les paramètres optimum concernant la thérapie, le ciblage et le diagnostic IRM (Figure 112). Les caractéristiques requises de ces nanoparticules sont une faible taille qui leur confère une furtivité *in vivo*, une biodistribution optimale<sup>[333]</sup>, une efficacité photodynamique (fort rendement quantique d'oxygène singulet), une sélectivité pour les NRP-1 et un réhaussement positif de l'intensité du signal IRM. Dans ce but, nous avons modifié la taille du cœur et de la couche de silice, le nombre de photosensibilisateurs, le type de surfactants en faisant varier les paramètres de synthèse de ces nanoparticules.

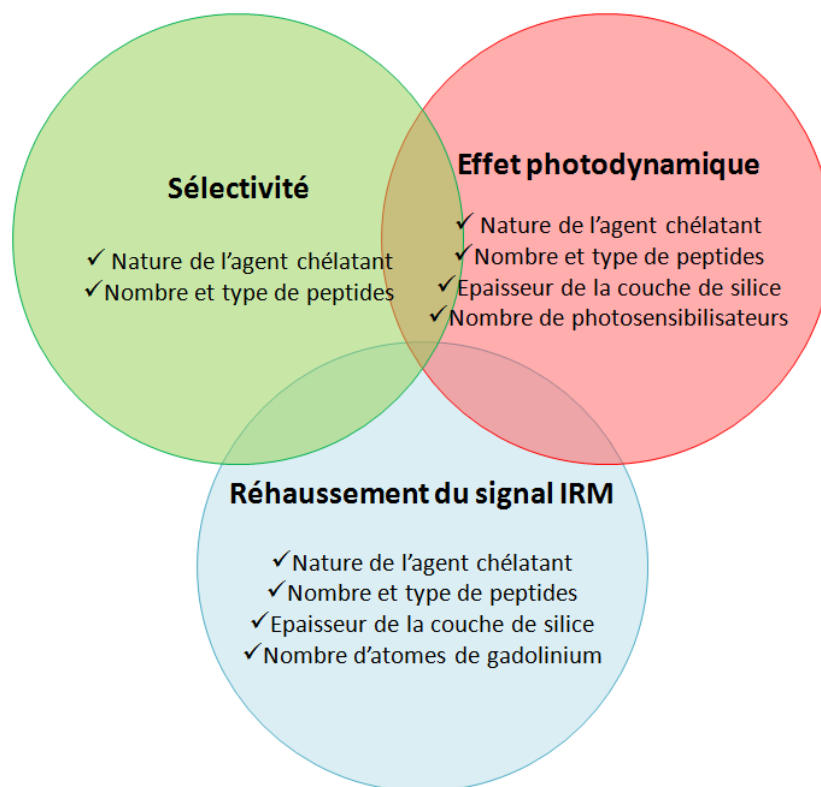


Figure 112 : Schéma de l'interconnection des trois fonctionnalités prises en compte pour l'élaboration du plan d'expérience.

## II. 2. Plan d'expérience

Suite aux travaux effectués par Pierre Couleaud lors de sa thèse (2007-2010)<sup>[333]</sup>, il est apparu nécessaire d'élaborer un plan d'expérience pour déterminer les paramètres clés qui permettront de conduire à



l'élaboration d'une nanoparticule idéale. Afin de trouver les meilleures combinaisons entre les paramètres de construction des nanoparticules, il a été indispensable d'élaborer une méthodologie expérimentale associée à un plan d'expériences (Thierry Bastogne) permettant de réduire considérablement le nombre de nanoparticules à synthétiser et par conséquent le temps consacré et le coût financier.

## II. 2. a. Définition

Le terme *plan d'expériences* regroupe des méthodes et des outils statistiques de modélisation expérimentale qui reposent sur la production et la collecte de données quantitatives. Ces informations sont ensuite compilées pour élaborer des modèles mathématiques du type :

$$\begin{cases} Y = Z + E \\ Z = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \end{cases}$$

Y représente la variable à expliquer (ou réponse) et  $(X_1, X_2)$  sont les variables explicatives (ou facteurs) que l'expérimentateur peut arbitrairement modifier pendant les expériences.

E est une variable aléatoire qui suit généralement la loi normale centrée utilisée pour décrire la partie inexpliquée et la variabilité de la réponse.

Z représente la réponse théorique prédite par le modèle avec les termes  $b_i$  pour coefficients.

Ce type de modèle permet de répondre à trois types de problématiques :

- Le criblage : il consiste à isoler les facteurs les plus influents parmi un grand nombre de facteurs étudiés.
- L'analyse des effets : elle consiste à mesurer et à comparer l'influence des facteurs et de leurs interactions  $(X_1, X_2)$  pour identifier les effets synergiques potentiels entre ces facteurs.
- L'optimisation : elle a pour objectif soit de minimiser, soit de maximiser la réponse Y.

Le criblage et l'analyse d'effet sont résolus à l'aide des coefficients  $b_i$  du modèle. La valeur de ces coefficients permet d'estimer l'influence du facteur associé ou de l'interaction  $(X_1, X_2)$  considérée. L'optimisation, quant à elle, est obtenue en utilisant la réponse prédite par le modèle Z pour chercher les valeurs des paramètres permettant sa minimisation ou sa maximisation.

Cependant, les termes  $b_i$  sont indispensables pour résoudre les trois problématiques énoncées précédemment. Les expériences de laboratoire deviennent donc obligatoires et cruciales à la détermination des termes  $b_i$ .

## II. 2. b. Principe

Un plan d'expériences consiste à chercher quelles sont les expériences à réaliser pour obtenir une précision acceptable des coefficients ou de la réponse prédite (Figure 113). Il existe plusieurs ouvrages concernant ce type de méthodes <sup>[334-338]</sup>.

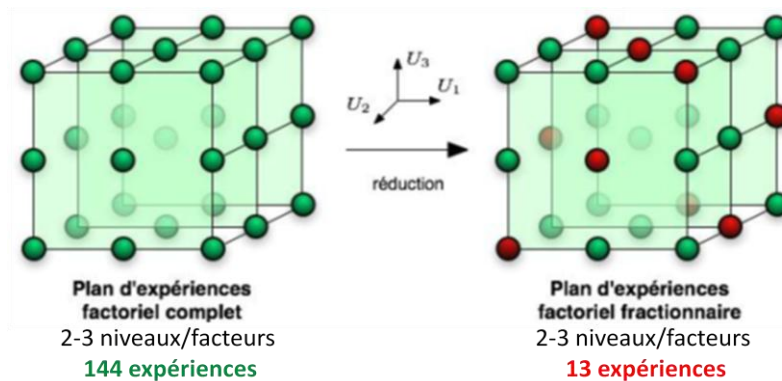


Figure 113 : Représentations de plans d'expérience factoriels complets et fractionnaires, adapté de la référence [333].

Cette approche expérimentale permet de réduire les coûts expérimentaux en conservant une démarche rationnelle de l'étude à effectuer. Cependant, cette application d'un modèle théorique à des paramètres expérimentaux peut induire quelques limites quant à l'interprétation des résultats obtenus. La méthodologie des plans d'expériences permet donc d'obtenir une tendance générale en ce qui concerne les différents paramètres et leurs valeurs mais elle n'est pas en mesure de donner des valeurs exactes attribuables aux paramètres expérimentaux.

## II. 2. c. Application de cette approche

Les paramètres influents pris en compte lors de l'élaboration du plan d'expérience associé à cette thèse correspondent à chaque partie de la synthèse des nanoparticules hybrides, associées chacune à une valeur numérique. Les cinq paramètres pris en compte pour sa mise en place sont :

- La taille des cœurs de  $Gd_2O_3$ ,
- Le type d'agent chélatant greffé à la surface de la nanoparticule,
- La taille de la couche de polysiloxane autour du cœur,
- Le taux de TPC greffée dans la coque de silice,
- Le type et le nombre de peptides greffés autour des nanoparticules.

Le choix des différents paramètres a été préalablement validé lors de la thèse de Pierre Couleaud en prenant en compte les méthodes de mesures suivantes :

- La sélectivité qui consiste en l'étude de l'affinité moléculaire (test ELISA) de la nanoparticule après greffage du peptide vis-à-vis de la protéine recombinante NRP-1,
- L'efficacité photodynamique des nanoparticules qui correspond à l'étude de leur cytotoxicité à l'obscurité et de leur efficacité photodynamique *in vitro*,
- Le réhaussement du signal IRM qui est étudié par un test *in vivo* en imagerie de résonance magnétique sur des rats xéno greffés par un modèle de tumeur astrocytaire de haut-grade (cellules U87).

L'utilité d'élaborer un plan d'expérience pour cette étude prend toute sa mesure lorsque l'on compare les 13 lots issus de celui-ci aux 144 lots qu'il aurait fallu synthétiser puis tester si cette stratégie n'avait pas été mise en place.

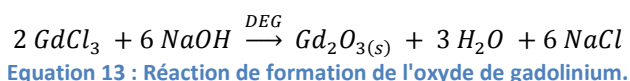
Afin de réaliser ce travail, il a été nécessaire de synthétiser les nanoparticules, le PS encapsulé ainsi que les peptides greffés en surface des nanoparticules.

## II. 2. c. i. Les nanoparticules : paramètres modifiés

Les nanoparticules utilisées dans cette thèse sont constituées d'un cœur d'oxyde de gadolinium obtenu par une synthèse polyol de type *bottom-up*.

### • Les cœurs

Les nanoparticules qui ont été utilisées pour réaliser ce plan d'expérience ont été développées et optimisées par l'équipe FENNEC (Formation et Elaboration de Nanomatériaux et Cristaux) de l'ILM (Institut Lumière Matière) de Lyon. Cette synthèse permet d'obtenir des cœurs d'oxydes de gadolinium (Equation 13) de petites tailles possédant un meilleur réhaussement en IRM que les premiers cœurs utilisés au début de la thèse de Pierre Couleaud.



Les mesures effectuées, entre autres, par la méthode DLS ont permis de mettre en évidence des tailles monodisperses d'environ 1,0 nm pour les « petits cœurs » (PC) et d'environ 3,0 nm pour les « gros cœurs » (GC) (Figure 114).

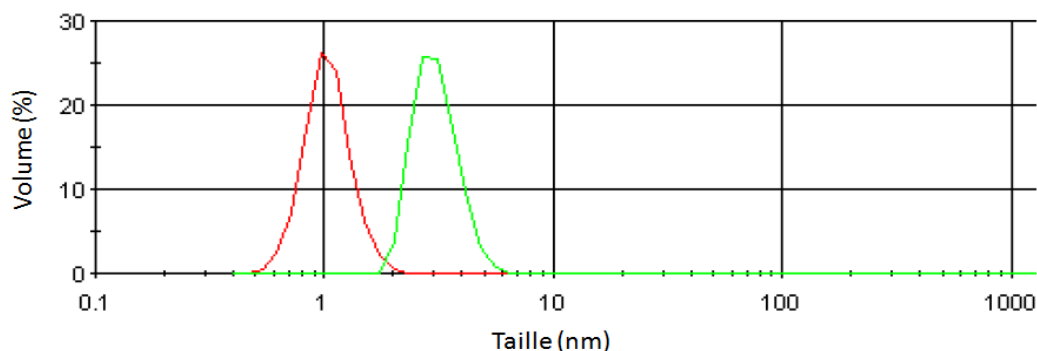


Figure 114 : Graphiques des distributions de tailles en volume, obtenues par la méthode DLS (*Dynamic Light Scattering*) ( $\lambda_{\text{exc.}} = 633 \text{ nm}$ ) des GC et des PC dans le DEG, adapté de la référence [333]. La courbe rouge correspond aux PC et celle en vert correspond aux GC, dans le diéthylène glycol (DEG).

Le choix de l'utilisation de l'oxyde de gadolinium réside dans ces propriétés paramagnétiques et son numéro atomique élevé, comme cela a été mentionné précédemment. De plus, cet élément s'avère être potentiellement utilisable pour des applications en temps qu'agent radiosensibilisant et pour la capture neutronique [339, 340].

Les synthèses sont effectuées dans le DEG qui est un solvant possédant un point d'ébullition (245°C) et une viscosité élevés (39 cP) qui permettent de contrôler la dispersion de taille et d'éviter l'agglomération [339].

• L'enrobage (la couche de polysiloxane)

Les premiers travaux effectués par Pierre Couleaud sur des nanoparticules comportant 47 atomes de silice par atome de gadolinium (47 Si/Gd) ont montré un réhaussement de signal IRM insuffisant pour une utilisation *in vivo*. L'amélioration des techniques de synthèse par l'équipe FENNEC ont ensuite permis d'obtenir des nanoparticules possédant une coque de silice avec une stœchiométrie de 1 à 4 Si/Gd, ce qui donne des nano-objets d'une taille de 2 à 5 nm qui offrent un meilleur réhaussement positif en IRM [333]. Cette couche de polysiloxane est obtenue à partir d'un mélange de précurseurs silanés TEOS/APTES (40%/60% en moles) (Figure 115, Figure 116). Cet enrobage permet à la fois de protéger le cœur d'oxydes de la dissolution afin d'éviter la libération des ions  $Gd^{3+}$  toxiques et d'éviter l'agglomération des nanoparticules. De plus, cette coquille permet la fonctionnalisation ultérieure de la nanoparticule par l'intermédiaires des fonctions amines ( $-NH_2$ ) de surface apportées par l'APTES. Le bras aminopropyle de l'APTES permet de greffer des molécules comme les photosensibilisateurs (chlorine) et les agents de chélation (DOTA, DTPA) [339].

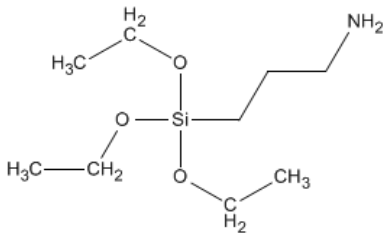


Figure 115 : Structure chimique du (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES).

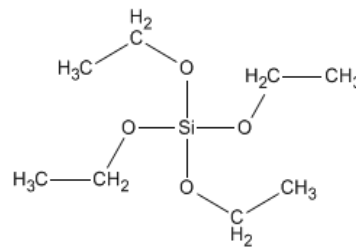


Figure 116 : Structure chimique du tétraéthoxysilane (TEOS).

L'étape d'enrobage est effectuée, dans le DEG, par plusieurs ajouts successifs d'APTES et de TEOS dans les proportions 60/40 en moles. Chaque ajout comprend 0,5 mole de Si par mole de Gd (soit 0,3 APTES et 0,2 TEOS/1 Gd). Cette réaction est catalysée par un mélange basique constitué de triéthylamine ( $Et_3N$ ) et d'eau dans le DEG [339]. Il se forme alors un réseau polysiloxane réticulé par des réactions d'hydrolyse-condensation (Figure 117, Figure 118).

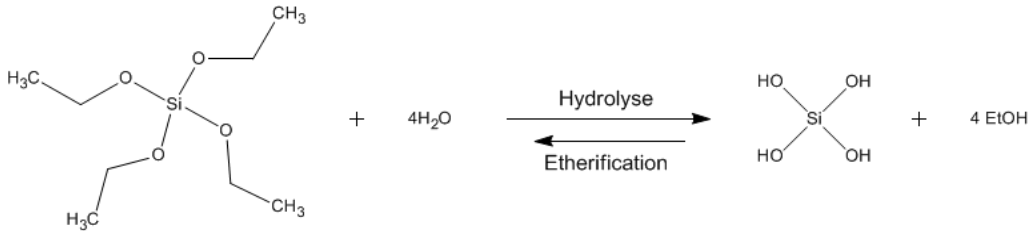


Figure 117 : Réaction d'hydrolyse du TEOS.

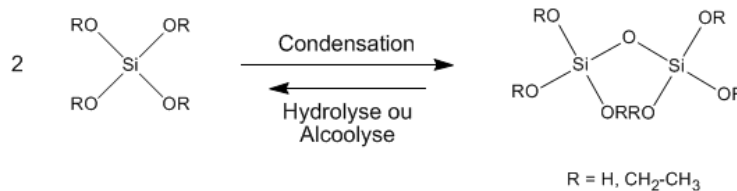


Figure 118 : Réaction de condensation du TEOS et du produit d'hydrolyse du TEOS, d'après les références [339, 341].

• Fonctionnalisation des nanoparticules avec les agents chélatants DTPA et DOTA

L'ajout de molécules hydrophiles à la surface des nanoparticules est un paramètre essentiel pour leur conférer une bonne dispersion en solution aqueuse grâce à la stabilisation électrostatique par les répulsions de Coulomb créées par leurs charges électrostatiques de surface. Ces molécules, en occupant la surface des nanoparticules, offrent également une stabilisation stérique qui permet de maintenir les nanoparticules éloignées les unes des autres <sup>[342]</sup>. De plus, ce type de fonctionnalisation rend les nanoparticules furtives vis-à-vis de l'absorption des protéines endogènes (osponisation) <sup>[333]</sup>. Les deux molécules hydrophiles utilisées sont le DTPA (acide diéthylènetriamine pentaacétique) (Figure 119) et le DOTA (acide 1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique), un ligand cyclique (Figure 120). Celles-ci sont couramment utilisées comme agents de chélation en imageries IRM, TEM et TEP du fait de leur biocompatibilité et de leur capacité à complexer certains ions d'intérêt médical, tels que  $Gd^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $^{111}In^{3+}$ ,  $^{99m}Tc^{4+}$ ,  $^{68}Ga^{3+}$ ,  $^{64}Cu^{2+}$ ,  $^{86}Y^{3+}$ , etc <sup>[339]</sup>.

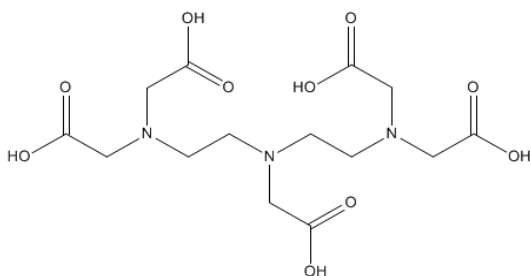


Figure 119 : Structure chimique du DTPA.

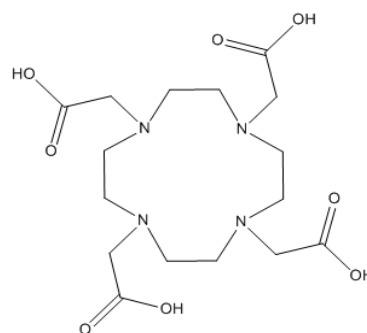


Figure 120 : Structure chimique du DOTA.

Ces deux molécules, *via* leurs fonctions acides carboxyliques et leurs atomes d'azote vont chélater les ions  $Gd^{3+}$  sans modifier les propriétés paramagnétiques de ces ions. De ce fait, il est plus juste d'utiliser le terme d'« agents chélatants » plutôt que celui de « surfactants » étant donné qu'il s'agit de ligands polydentés. Deux complexes ont reçu leurs AMM et sont actuellement vendus sous formes de solutions injectables, connues sous les noms de DOTAREM® pour le complexe  $[Gd(DOTA)(H_2O)]^-$  (Figure 121) et Magnevist® pour le complexe  $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$  <sup>[343]</sup> (Figure 122). Cependant, il a été montré que les complexes cycliques présentent une constante de chélation et une durée de vie de chélation plus élevées que leurs homologues linéaires <sup>[344]</sup>, ce qui laisse penser que le DOTA serait la molécule la plus adéquate pour le greffage en surface des nanoparticules. Il semble également important de tenir compte du fait qu'une fois en solution aqueuse et placé en présence de ces deux ligands, le  $Gd^{3+}$  forme un complexe par la mise en commun des électrons non liants de tous les atomes d'azotes et de toutes les fonctions carboxylates de l'agent chélatant. L'ion central se coordine également avec une molécule d' $H_2O$  <sup>[343]</sup>. Ceci permet la stabilisation de ces complexes afin que l'ion gadolinium ( $[Xe] 4f^7 5d^0 6s^0$ ) acquière la structure électronique ( $[Xe] 4f^{14} 5d^9 6s^2 4p^6$ ) la plus proche possible de celle du radon ( $[Xe] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 4p^6$ ).

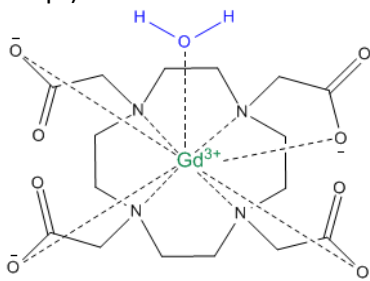


Figure 121 : Structure chimique du DOTAREM®, avec une molécule d'eau dans la sphère de coordination du gadolinium.

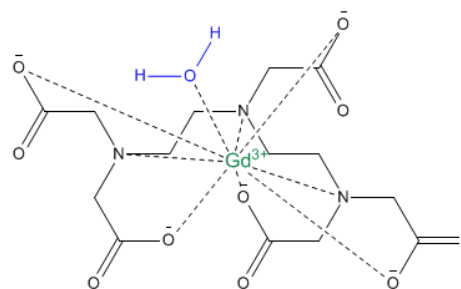


Figure 122 : Structure chimique du Magnevist®, avec une molécule d'eau dans la sphère de coordination du gadolinium.

Afin d'optimiser le greffage des agents chélatants, l'équipe FENNEC utilise les formes activées de ces molécules, le DTPA-BA (acide diéthylènetriamine pentaacétique-bis-anhydride) (Figure 123) et le DOTA-GA (acide 1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique-anhydride glutarique) (Figure 124) <sup>[339]</sup>.

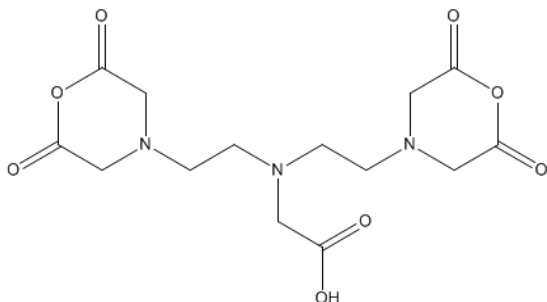


Figure 123 : Structure chimique du DTPA-BA.

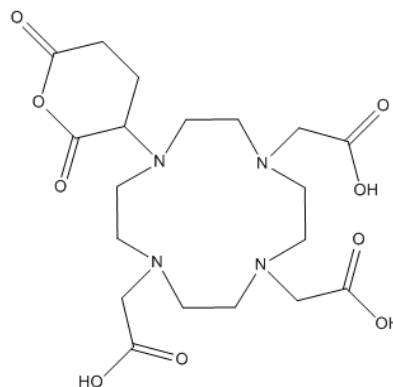


Figure 124 : Structure chimique du DOTA-GA.

La fonctionnalisation des nanoparticules hybrides a été réalisée à l'aide de l'une ou l'autre de ces molécules. Le couplage de ces agents chélatants à la surface des nanoparticules est obtenu par la formation d'une liaison amide entre une fonction acide carboxylique et une fonction amine se trouvant à la surface de la nanoparticule (Figure 125).

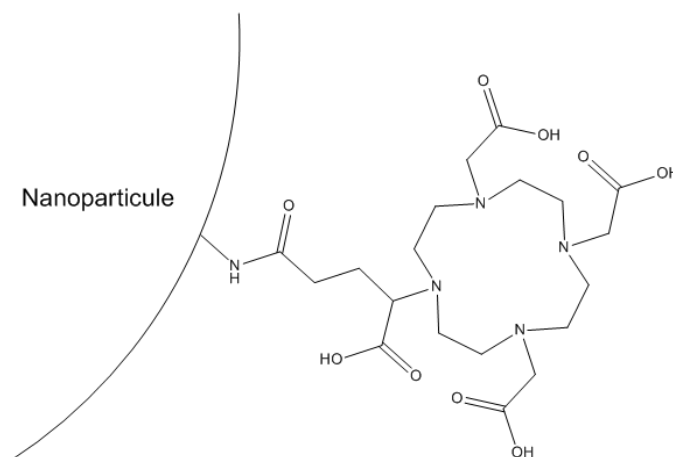


Figure 125 : Schéma de fonctionnalisation d'une nanoparticule avec le DOTA-GA.

## II. 2. c. ii. Le photosensibilisateur

La 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl-21,23-chlorine, également nommée TPC-COOH ou C<sub>1</sub>-COOH, a été choisie car elle possède un coefficient d'absorption molaire élevé à 650 nm et une fonction acide carboxylique sur un de ces groupements phényle qui permet de la greffer à une autre molécule. De plus, elle possède un bon rendement de formation en oxygène singulet qui permet de l'utiliser en PDT. Cette molécule est obtenue en deux étapes dont la première consiste en la synthèse de la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl-21,23-porphyrine notée P<sub>1</sub>-COOH.

### • Synthèse de la P<sub>1</sub>-COOH

Cette porphyrine monocarboxylée est synthétisée suivant la méthode de Lindsey qui consiste à condenser quatre équivalents de pyrrole avec un équivalent de 4-carboxybenzaldéhyde et trois équivalents de benzaldéhyde préalablement distillés. Cette réaction, effectuée dans le DCM anhydre en présence de BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> et sous argon, donne un intermédiaire porphyrinogène qui est oxydé en porphyrine (P<sub>1</sub>-COOH) par ajout de *p*-chloranil (2,3,5,6-tétrachloro-1,4-benzoquinone) (Figure 126). Le DCM est ensuite évaporé et le brut réactionnel est solubilisé dans un mélange DCM/EtOH (97:3, v/v) avant d'être filtré sur silice pour enlever la majorité des goudrons formés. Ce brut « dégrossi » est ensuite purifié par plusieurs colonnes chromatographiques successives. Elles sont effectuées avec une phase stationnaire de silice normale et un éluant isocratique DCM/EtOH (97:3, v/v). Cette synthèse donne un rendement moyen d'environ 7%, ce qui est dû à la formation importante de goudrons engendrés par l'ajout de *p*-chloranil.

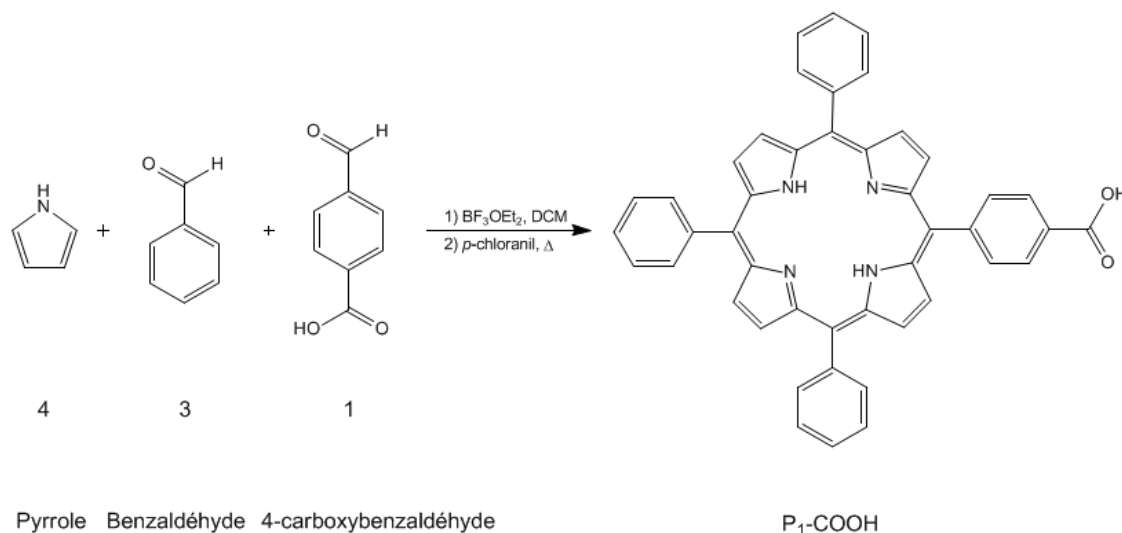


Figure 126 : Réaction de synthèse de la P<sub>1</sub>-COOH.

### • Synthèse de la TPC-COOH

La TPC-COOH est obtenue suivant la méthode de Whitlock. Cette méthode consiste à réduire la porphyrine par le *p*-TSH (*para*-toluènesulfonylhydrazine) en présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans la pyridine distillée, à reflux et sous argon. La P<sub>1</sub>-COOH est réduite en la bactériochlorine correspondante en ajoutant directement 40 équivalents de *p*-TSH et 80 équivalents de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> puis en portant le mélange à reflux pendant 4 heures. Il se forme alors un mélange de bactériochlorine et de chlorine. Le brut réactionnel de la bactériochlorine est ensuite dissout dans l'acétate d'éthyle (AcOEt) et placé sous argon. Cette



molécule est réduite en sa chlorine correspondante par des ajouts successifs d'*o*-chloranil (3,4,5,6-tétrachloro-1,2-benzoquinone) en quantité définie et préalablement dissout dans l'AcOEt ( $C = 600 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (Figure 127). Cette étape consiste à réoxyder la bactériochlorine en chlorine sans pour autant pousser la réaction jusqu'à l'oxydation totale qui conduirait à la formation de porphyrine (Figure 127). Pour cela, la solution d'*o*-chloranil est ajoutée progressivement (un ajout toutes les 15 minutes) et un spectre UV-visible de la solution est fait avant chaque nouvel ajout. Lorsque le spectre correspond à celui de la chlorine sans bactériochlorine (des traces de porphyrine peuvent être présentes), la réaction est stoppée par l'ajout d'un volume d'eau conséquent (100 mL) afin d'éviter la réduction de la TPC-COOH en  $P_1$ -COOH.

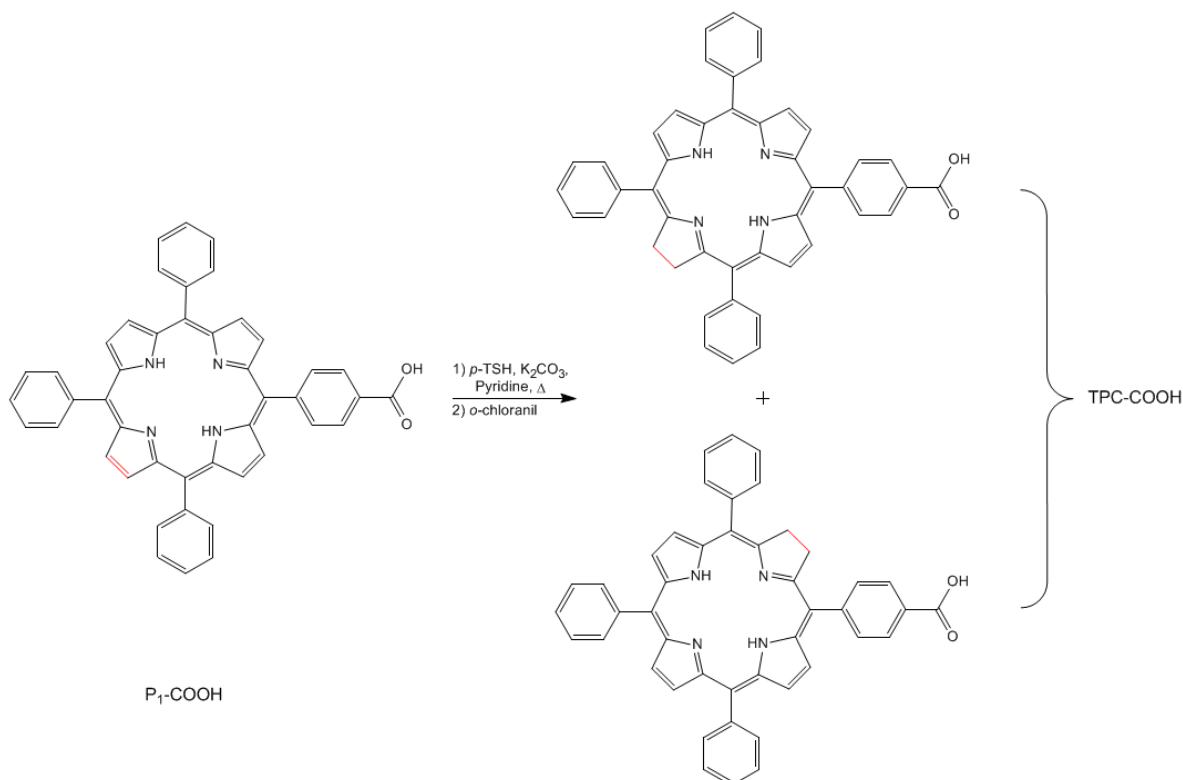


Figure 127 : Schéma de synthèse de la TPC-COOH à partir de la  $P_1$ -COOH.

La chlorine est ensuite séchée par lyophilisation ou sous vide. Le brut réactionnel ainsi obtenu est purifié sur colonne HPLC Si- $C_{18}$  avec un gradient MeOH/ $H_2O$  en présence de TFA. Cette étape donne des rendements moyens de l'ordre de 40%. Il est possible d'expliquer cette valeur faible du fait de la formation de  $P_1$ -COOH à partir de la bactériochlorine lors de la réaction d'oxydation ainsi qu'aux pertes durant les phases de lavage du produit qui interviennent après celle de l'oxydation. De plus, la TPC-COOH peut, en présence d'humidité, se réoxyder en  $P_1$ -COOH. L'étape d'oxydation avec l'*o*-chloranil n'étant pas stéréosélective, il se forme un mélange de deux isomères de la TPC-COOH qui sont isolables par HPLC (Figure 128). Cependant, ces deux isomères possédant les mêmes propriétés photophysiques<sup>[248]</sup>, ils ne sont pas séparés lors de l'étape de purification.

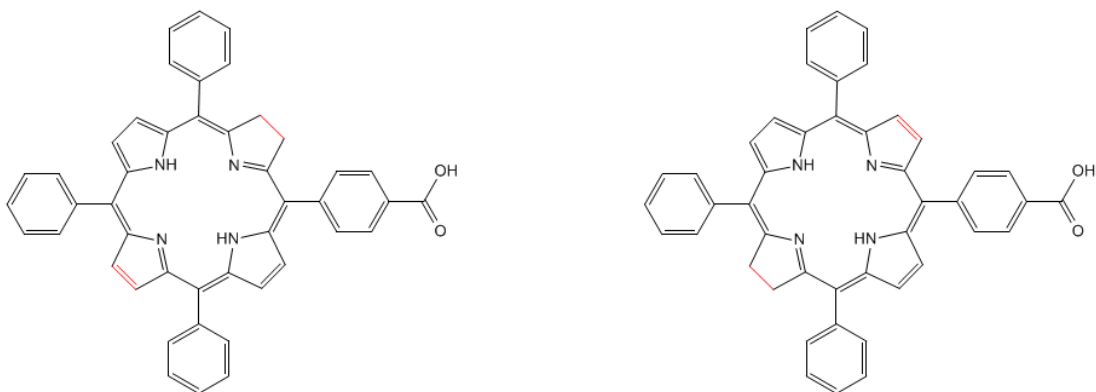


Figure 128 : Structures chimiques des deux isomères de la TPC-COOH.

La fonction acide carboxylique de la TPC-COOH obtenue est ensuite activée.

### • Synthèse de la TPC-NHS

La TPC-COOH est solubilisée (200 mg pour 20mL) dans le DCM sous agitation magnétique et sous argon puis 1,5 équivalent de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) est ajouté avec 1,5 équivalent de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et le mélange est laissé à réagir à reflux du DCM pendant 4 heures (Figure 129). Le brut réactionnel est ensuite purifié par colonne chromatographique avec comme éluant le DCM. La TPC-NHS pure est obtenue avec un rendement d'environ 90% puis elle est séchée et conservée au sec, sous argon, à l'abri de la lumière.

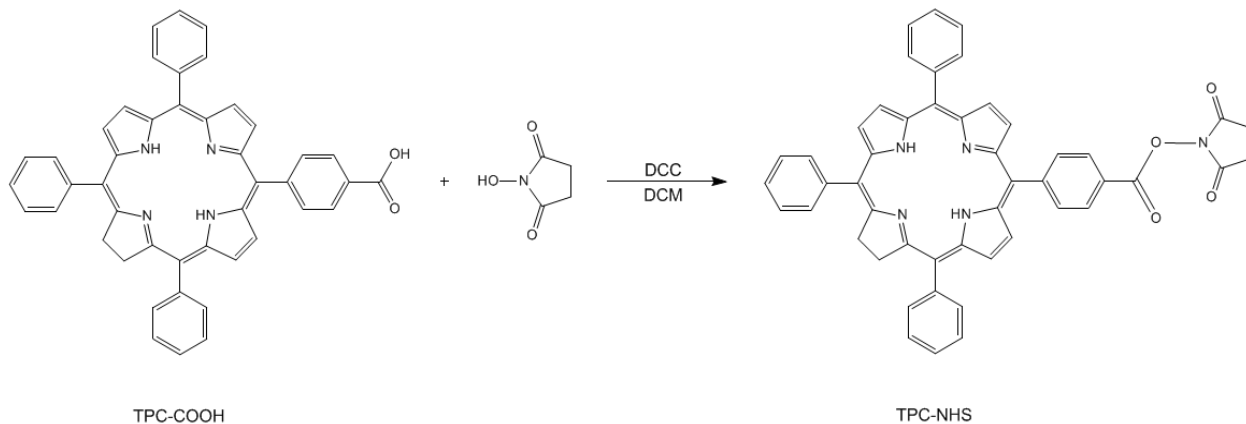


Figure 129 : Schéma réactionnel de synthèse de la TPC-NHS.

## II. 2. c. iii. Caractérisations photophysiques des photosensibilisateurs

Les propriétés photophysiques de chaque échantillon ont été déterminées dans l'EtOH à 25°C.

### • Propriétés photophysiques de la P<sub>1</sub>COOH

#### - Propriétés d'absorption UV-visible

Le spectre UV-visible de la P<sub>1</sub>-COOH est constitué d'une bande de Soret avec un maximum d'absorption à 414 nm et de quatre bandes Q, d'intensités plus faibles, situées entre 512 nm et 650 nm (Figure 130).

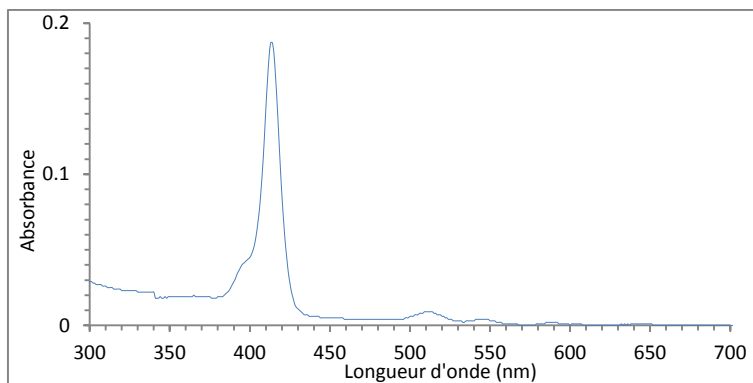


Figure 130 : Spectre d'absorption UV-visible de la P<sub>1</sub>-COOH dans l'EtOH.

Les composés sont analysés à faible concentration, inférieure ou égale à  $10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> ( $DO_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ ), afin d'éviter de former des dimères<sup>[227]</sup>. Les calculs des coefficients d'absorption molaire ont été effectués plusieurs fois avec des solutions de différentes concentrations en photosensibilisateur (Tableau 8).

Tableau 8 : Coefficients d'absorption molaire des la P<sub>1</sub>-COOH dans l'EtOH en fonction des longueurs d'onde d'absorption.

Bande d'absorption	Longueur d'onde (nm)	Coefficient d'absorption molaire (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
Bande de Soret	414	295371
Q <sub>IV</sub>	512	12307
Q <sub>III</sub>	545	5469
Q <sub>II</sub>	588	2735
Q <sub>I</sub>	650	1367

### - Propriétés d'émission de fluorescence

Le spectre d'émission de fluorescence de la P<sub>1</sub>-COOH est obtenu après excitation 414 nm (Figure 131). Il est composé de deux pics avec des maximums à 650 nm pour le pic le plus intense et à 720 nm pour le pic moins intense. Cette double bande est caractéristique du spectre de fluorescence des *méso*-tétraphénylporphyrines.

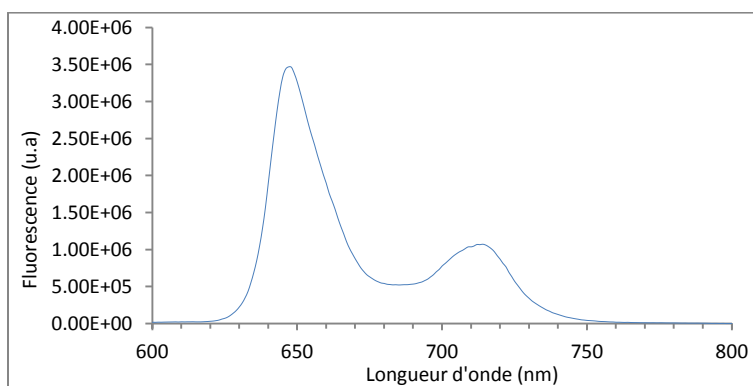


Figure 131 : Spectre d'émission de fluorescence de la P<sub>1</sub>-COOH dans l'EtOH, excitée à 414 nm.

Le spectre de fluorescence d'un fluorophore permet de calculer son rendement quantique de fluorescence en comparant les valeurs des aires situées sous la courbe de l'échantillon et d'une référence. La référence utilisée ici est la TPP dans le toluène.

$$\Phi_f = \Phi_{f0} \times \frac{I_f}{I_{f0}} \times \frac{A_{0\lambda}}{A_\lambda} \times \left(\frac{n}{n_0}\right)^2$$

Equation 14 : Equation de calcul du rendement quantique de fluorescence.

$A_\lambda$  = Densité optique de l'échantillon à la longueur d'onde d'excitation  $\lambda$  ;  $A_{0\lambda}$  = Densité optique de la référence à la longueur d'onde d'excitation  $\lambda$  ;  $I_f$  = Intensité de fluorescence de l'échantillon (aire sous la courbe) ;  $I_{f0}$  = Intensité de fluorescence de la référence (aire sous la courbe) ;  $\Phi_{f0}$  = Rendement quantique de fluorescence de la référence ;  $n$  = Indice de réfraction du solvant de l'échantillon ;  $n_0$  = Indice de réfraction du solvant de la référence.

Dans notre cas, on a :

$$\Phi_{f0} = \Phi_{f(TPP)} = 0,11 \text{ avec } n_0 = n_{\text{toluène}} = 1,496 \text{ et } n = n_{\text{EtOH}} = 1,360.$$

$$\Phi_f = 0,14 \pm 0,02$$

### - Formation d'oxygène singlet

La formation d'oxygène singlet est détectée à partir de sa luminescence dans le proche infrarouge, dont le maximum se situe vers 1270 nm, après l'excitation du PS à 414 nm. Le spectre possède une allure de gaussienne centrée vers le maximum d'émission à 1270 nm (Figure 132).

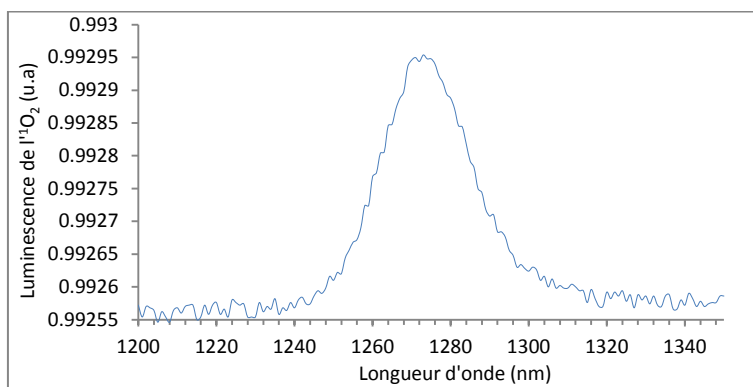


Figure 132 : Spectre d'émission de luminescence de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> dans l'EtOH après excitation de la P<sub>1</sub>-COOH à 414 nm.

Le rendement quantique de luminescence de l'oxygène singlet formé suite à l'excitation de la P<sub>1</sub>-COOH est calculé à partir de la formule ci-dessous. La référence utilisée est le rose de bengale dans l'éthanol [87].

$$\Phi_\Delta = \Phi_{\Delta0} \times \frac{I_l}{I_{l0}} \times \frac{A_{0\lambda}}{A_\lambda} \times \left(\frac{n}{n_0}\right)^2$$

Equation 15 : Equation de calcul du rendement quantique de luminescence de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

$A_\lambda$  = Densité optique de l'échantillon à la longueur d'onde d'excitation  $\lambda$  ;  $A_{0\lambda}$  = Densité optique de la référence à la longueur d'onde d'excitation  $\lambda$  ;  $I_l$  = Intensité de luminescence de l'échantillon (aire sous la courbe) ;  $I_{l0}$  = Intensité de luminescence de la référence (aire sous la courbe) ;  $\Phi_{\Delta0}$  = Rendement quantique de luminescence de la référence ;  $n$  = Indice de réfraction du solvant de l'échantillon ;  $n_0$  = Indice de réfraction du solvant de la référence.

Dans notre cas, on a :

$$\Phi_{\Delta 0} = \Phi_{\Delta(\text{rose de bengale})} = 0,69 \pm 0,05 \text{ avec } n = n_0 = n_{\text{EtOH}} = 1,360.$$

$$\Phi_{\Delta} = 0,64 \pm 0,05$$

## • Propriétés photophysiques de la TPC-COOH

### - Propriétés d'absorption

La chlorine possède un spectre d'absorption UV-visible constitué d'une bande de Soret large, beaucoup moins intense que celle de la porphyrine correspondante, dédoublée par rapport à la P<sub>1</sub>-COOH et dont les maximums d'absorption se situent à 406 nm et 423 nm (Figure 133). Le spectre est également composé des bandes Q entre 512 nm et 650 nm avec la bande Q<sub>I</sub> environ 15 fois plus intense que celle de la porphyrine.

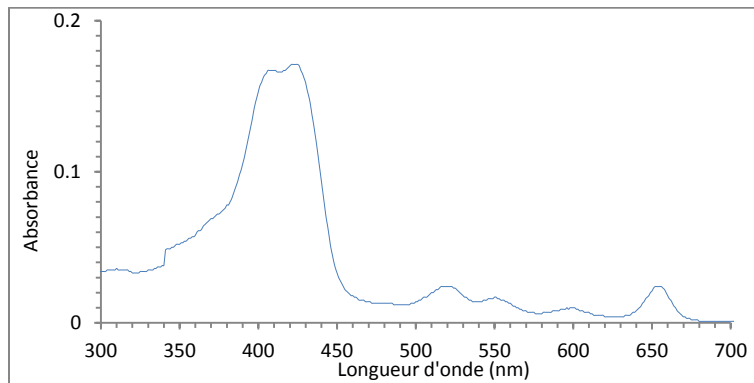


Figure 133 : Spectre d'absorption UV-visible de la TPC-COOH dans l'EtOH.

La réalisation de droites étalons de la TPC-COOH à plusieurs concentrations, dans un solvant donné, permet de calculer les coefficients d'absorption molaire ( $\epsilon$ ) de chaque pic d'absorption (Tableau 9).

Tableau 9 : Coefficients d'absorption molaire de la TPC-COOH dans l'EtOH en fonction des longueurs d'onde d'absorption.

Bande d'absorption	Longueur d'onde (nm)	Coefficient d'absorption molaire ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
Bande de Soret	414	85000
Q <sub>IV</sub>	512	9800
Q <sub>III</sub>	545	6500
Q <sub>II</sub>	588	5000
Q <sub>I</sub>	650	21000

- **Propriétés d'émission de fluorescence**

Le spectre d'émission de fluorescence de la TPC-COOH est similaire à celui de la P<sub>1</sub>-COOH mais avec une diminution de la bande d'émission à 720 nm (Figure 134).

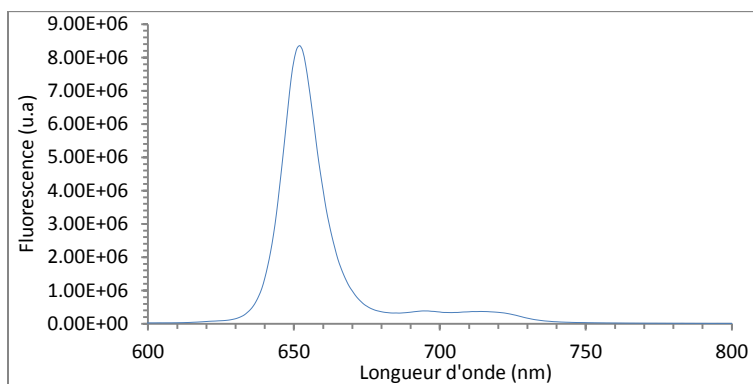


Figure 134 : Spectre de fluorescence de la TPC-COOH dans l'EtOH, excitée à 414 nm.

Dans notre cas, on a :

$$\Phi_{f0} = \Phi_{f(TPP)} = 0,11 \text{ avec } n_o = n_{\text{toluène}} = 1,496 \text{ et } n = n_{\text{EtOH}} = 1,360.$$

$$\Phi_f = 0,23 \pm 0,02$$

- **Formation d'oxygène singulet**

Le spectre de luminescence de l'oxygène singulet formé par la TPC-COOH est obtenu de la même façon que celui de la P<sub>1</sub>-COOH et il possède des caractéristiques similaires (Figure 135).

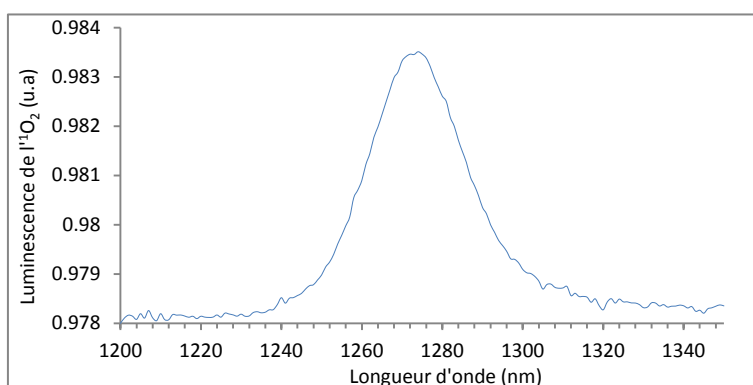


Figure 135 : Spectre de luminescence de l'oxygène singulet formé suite à l'excitation de la TPC-COOH à 414 nm.

Dans notre cas, on a :

$$\Phi_{\Delta 0} = \Phi_{\Delta(\text{Rose de Bengale})} = 0,69 \pm 0,05 \text{ avec } n = n_o = n_{\text{EtOH}} = 1,360.$$

$$\Phi_{\Delta} = 0,70 \pm 0,05$$

## • Propriétés photophysiques de la TPC-NHS

### - Propriétés d'absorption

La TPC-NHS possède un spectre d'absorption UV-visible similaire à celui de la TPC-COOH. Il est constitué d'une bande de Soret possédant la même allure que celle de la TPC-COOH (Figure 136). Ce spectre possède également les bandes Q entre 512 nm et 650 nm.

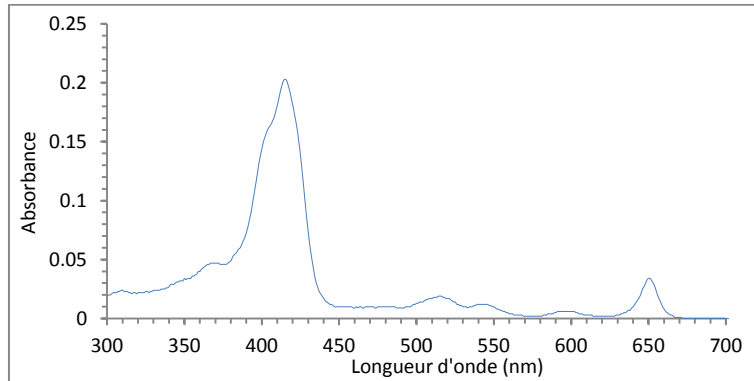


Figure 136 : Spectre d'absorption UV-visible de la TPC-NHS dans l'EtOH,  $D_{0(414\text{ nm})} \approx 0,2$ .

La TPC-COOH et la TPC-NHS possèdent les mêmes coefficients d'absorption molaire (Tableau 10).

Tableau 10 : Coefficients d'absorption molaire des la TPC-NHS dans l'EtOH en fonction des longueurs d'onde d'absorption.

Bande d'absorption	Longueur d'onde (nm)	Coefficient d'absorption molaire ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
Bande de Soret	414	85000
$Q_{IV}$	512	9800
$Q_{III}$	545	6500
$Q_{II}$	588	5000
$Q_I$	650	21000

### - Propriétés d'émission de fluorescence

Le spectre d'émission de fluorescence de la TPC-NHS est similaire à celui de la TPC-COOH (Figure 137).

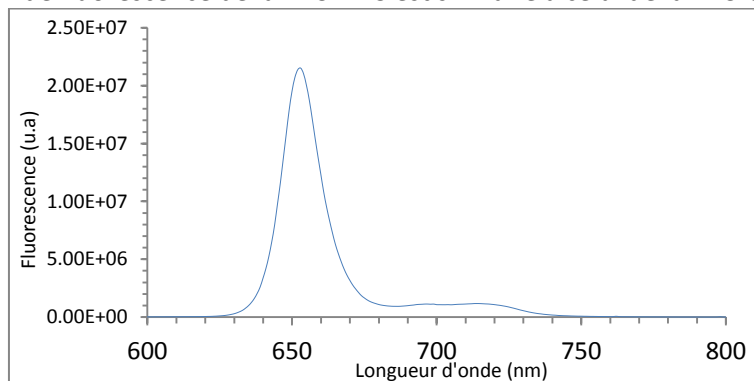


Figure 137 : Spectre de fluorescence de la TPC-NHS dans l'EtOH, excitée à 414 nm.



Dans notre cas, on a :

$$\Phi_{f0} = \Phi_{f(TPP)} = 0,11 \text{ avec } n_o = n_{\text{toluène}} = 1,496 \text{ et } n = n_o = n_{\text{EtOH}} = 1,360.$$

$$\Phi_f = 0,34 \pm 0,02$$

- **Formation d'oxygène singlet**

Le spectre de luminescence de l'oxygène singlet formé par la TPC-NHS est obtenu de la même façon que celui de la TPC-COOH et il possède les mêmes caractéristiques (Figure 138).

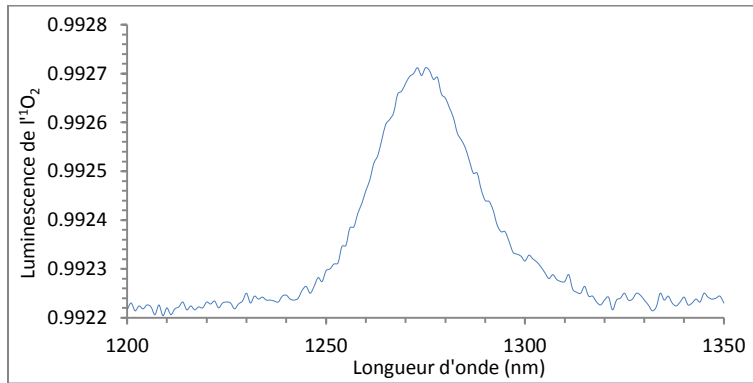


Figure 138 : Spectre de luminescence de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> formé après l'excitation à 414 nm de la TPC-NHS (Do<sub>(414 nm)</sub> ≈ 0,2).

Dans notre cas, on a :

$$\Phi_{\Delta 0} = \Phi_{\Delta(\text{rose de bengale})} = 0,69 \pm 0,05 \text{ avec } n = n_o = n_{\text{EtOH}} = 1,360.$$

$$\Phi_{\Delta} = 0,69 \pm 0,05$$

Les valeurs obtenues ci-dessus sont récapitulées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Rendements quantiques de fluorescence et de luminescence de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> dans l'EtOH, λ<sub>exc.</sub> = 414 nm.

Molécule	Φ <sub>f</sub>	Φ <sub>Δ</sub>
P <sub>1</sub> -COOH	0,14	0,64
TPC-COOH	0,23	0,70
TPC-NHS	0,34	0,69

## II. 2. c. iv. Influence de la concentration en photosensibilisateur sur les propriétés photophysiques des nanoparticules

Le taux de greffage du photosensibilisateur par nanoparticule nous a semblé être un paramètre important à prendre en compte <sup>[4]</sup>. En effet, les photosensibilisateurs sont connus pour s'agréger, ce qui entraîne une diminution de leurs rendements quantiques de fluorescence et de formation d'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> au détriment d'une action photodynamique efficace.

Afin de vérifier si le taux de PS greffés influence les rendements quantiques de fluorescence et de formation d'<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, une étude des propriétés photophysiques de la TPC greffée aux nanoparticules en fonction de la quantité de photosensibilisateur présent dans la coquille de polysiloxane a été effectuée, en comparaison avec les propriétés photophysiques de la TPC en solution. Pour cette étude, à proprement parler, j'ai synthétisé des nanoparticules constituées d'un cœur d'oxyde de gadolinium dopé avec du terbium (Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : Tb<sup>3+</sup> ; 50 : 50) enrobé d'une couche de polysiloxane (de taille constante de 2 Si) dans laquelle a été greffée de la chlorine à différentes concentrations. Le dopage en oxyde de gadolinium avec l'ion Tb<sup>3+</sup> n'avait pas d'intérêt pour cette étude à proprement parler mais, il devait servir à obtenir un potentiel transfert d'énergie entre cet ion ( $\lambda_{\text{émi.}} = 545 \text{ nm}$ ) et la chlorine greffée ( $\lambda_{\text{abs.}} = 550 \text{ nm}$ ) suite à une excitation par lumière ou par rayons X. Les 4 lots synthétisés nommés « nano5 », « nano10 », « nano20 », « nano50 » ont été théoriquement greffés avec respectivement 5, 10, 20, 50 TPC par nanoparticule. Après avoir effectué des mesures de densité optique, nous avons montré que le rendement moyen de greffage du photosensibilisateur est de 30% environ. Pour la suite de l'étude, trois hypothèses ont été faites : les nanoparticules sont monodisperses ; pour chaque lot, le nombre de PS par nanoparticule est homogène ; la répartition du PS est homogène dans chaque nanoparticule.

Les spectres d'absorption UV-visible de la TPC seule dans l'éthanol et ceux de la TPC couplée aux nanoparticules dans le même solvant et à la même concentration montrent des allures similaires <sup>[4]</sup> et les coefficients d'absorption molaire du spectre d'absorption UV-visible de ces molécules sont semblables. En revanche, nous pouvons observer une diminution des rendements quantiques de fluorescence et de luminescence de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> plus importante pour les PS greffés que pour les PS en solution lorsque l'on augmente le taux de PS. Si une diminution est attendue avec l'augmentation de la quantité de PS, due à l'effet de peau, la différence observée entre TPC libre et TPC greffée est due à d'autres phénomènes. Notre hypothèse est que deux types de transfert peuvent avoir lieu entre les photosensibilisateurs : un transfert longue distance type FRET et un transfert courte distance dû à la formations de dimères de PS greffés dans la coque de silice.

Cette étude nous montre l'intérêt de bien choisir son taux de PS : pour une efficacité maximale, un compromis doit être trouvé entre une charge importante de PS pour avoir une absorption de lumière et des effets photodynamiques conséquents, mais une charge trop élevée risque, d'une part, d'induire une cytotoxicité due au PS et, d'autre part, de réduire l'efficace photodynamique par diminution du rendement de production d'<sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

Ceci a conduit à l'utilisation de trois concentrations théoriques de photosensibilisateurs par nanoparticules, soit 0 mole de TPC par mole de Gd, 0,01 mole de TPC par mole de Gd ou 0,1 mole de TPC par mole de Gd qui correspondent respectivement à 0,  $\approx 0,002$  et  $\approx 0,02$  mole de TPC par mole de nanoparticules.

Cette étude a fait l'objet d'une publication que nous avons incluse ci-après.

## Long-distance energy transfer photosensitizers arising in hybrid nanoparticles leading to fluorescence emission and singlet oxygen luminescence quenching

Aymeric Sève,<sup>a</sup> Pierre Couleaud,<sup>a</sup> François Lux,<sup>b</sup> Olivier Tillement,<sup>b</sup> Philippe Arnoux,<sup>a</sup> Jean-Claude André<sup>a</sup> and Céline Frochot<sup>a</sup>

Received 30th September 2011, Accepted 25th January 2012

DOI: 10.1039/c2pp05324a

This paper presents energy transfer occurring in small organically modified core-shell nanoparticles (core lanthanide oxide, shell polysiloxane) (diameter < 10 nm) conjugated with photosensitizers designed for photodynamic therapy applications. These nanoparticles covalently encapsulate a photosensitizing PDT drug in different concentrations. Stable dispersions of the nanoparticles were prepared and the photophysical properties of the photosensitizers were studied and compared to those of the photosensitizers in solution. Increasing the photosensitizer concentration in the nanoparticles was not found to cause any changes in the absorption properties while fluorescence and singlet oxygen quantum yields decreased. As a possible explanation, we have suggested that both long distance energy transfer such as FRET and self-quenching could occur into the nanoparticles. A simple “trend” model of this kind of energy transfer complies with results of experiments on steady state fluorescence and singlet oxygen luminescence.

### 1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is one of the non-invasive ways of treating malignant tumors or macular degeneration.<sup>1,2</sup> After light excitation, the photosensitizer (PS) is promoted to the excited singlet state decays to the triplet state and generates highly reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen through intermolecular triplet-triplet energy transfer to oxygen. The ROS produced are toxic to cells and tissues and destroy cancer cells.<sup>3,4</sup>

As we have previously suggested, non-biodegradable nanoparticles (NPs) seem to be very promising carriers satisfying all the requirements for an ideal targeted PDT.<sup>5,6</sup> It has also been suggested that hybrid gadolinium oxide nanoparticles are useful for magnetic resonance imaging (MRI) and treatment<sup>7–9</sup> because of their small size (less than 50 nm of diameter), their polysiloxane shell, which allows the covalent coupling of a photosensitizer, and the fact that their polyethylene glycol (PEG) grafting allows the covalent coupling of peptide units, thus making them an ideal nanopatform for both imaging and PDT. We also investigated the influence of the length of different PEG on the biodistribution of hybrid gadolinium oxide NPs.<sup>9</sup> In this targeting strategy using nanomaterials, we conjugated a chlorin, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC) and the

ATWLPPR heptapeptide to a hybrid gadolinium oxide nanoparticle. We studied its functionalization and photophysical properties as well as cytotoxicity and *in vitro* photodynamic efficiency, describing for the first time the molecular affinity of the functionalized NP to NRP-1 molecular target.<sup>10</sup>

Aggregation is important in PDT because it occurs readily between photosensitizer molecules in water-rich media and the photophysical properties of aggregate species are different from those of the monomer. In particular, the aggregate is usually found to have lower singlet oxygen quantum yield and therefore a lower photodynamic efficacy induced by non-fluorescent dimers.<sup>11</sup> By covalently coupling the photosensitizer into a nanoparticle, it is thus possible to avoid aggregation. Nevertheless, if the loading is too high, this may result in interaction between PS units and a self-inhibition.

In this paper, we shall focus on the influence of the concentration of photosensitizer covalently linked into a nanoparticle onto the photophysical properties of the PSs. We showed experimentally and by elaborating a model that by increasing photosensitizer concentration we induced a Förster resonance energy transfer (FRET) associated with partial quenching linked to the formation of dimers or complexes.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Chemistry

Gadolinium chloride salt (3.346 g, GdCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) and terbium chloride salt (3.360 g, TbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) (1:1) were placed in

<sup>a</sup>LRGP, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR 3349 CNRS, Nancy, France

<sup>b</sup>LPCML, Laboratoire de Physico Chimie des Matériaux Luminescents (LPCML), UMR 5620 CNRS, Lyon, France. E-mail: celine.frochot@ensic.inpl-nancy.fr; Fax: + 33 3 83 37 81 20; Tel: + 33 3 83 17 15 15



120 mL of diethylene glycol (DEG) at room temperature with vigorous stirring. The suspension was heated at 180 °C until the total dissolution of lanthanide salts (about 1 h). When the solution was clear, sodium hydroxide solution (4 mL, 4.06 M) was added drop-by-drop with vigorous stirring again. Afterwards, the solution was heated and stirred at 180 °C for 3 hours. A transparent colloid of lanthanide oxide nanoparticles was obtained and stored at room temperature for weeks without alteration.

A solution containing TPC–NHS (40 mg) and 24.6  $\mu$ L of aminopropyltriethoxysilane (APTES) dissolved in 8.4 mL of anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO) was stirred during 2 hours to prepare the TPC–APTES precursor. The silane precursors (APTES (3.0 mL) and tetraethoxysilane (TEOS) (2.0 mL)) and hydrolysis solution (aqueous  $\text{Et}_3\text{N}$  in DEG ( $3.12 \times 10^{-6}$  M of TEA, 0.15 M of water)) were sequentially and alternatively added to 120 mL DEG solution containing  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ – $\text{Tb}_2\text{O}_3$  (50/50) nanoparticles ( $[\text{Ln}] = 45$  mM) under stirring at 40 °C. Addition of silane precursors and hydrolysis solution was performed in 6 steps. Each step consisted of the addition to the colloid of a portion of the silane precursor mixture followed by the addition of hydrolysis solution mixture. The solution containing the TPC coupled to the APTES (TPC–APTES) was added in the first step in addition to the other silane precursors (respectively 5, 10, 20 and 50 eq. TPC–APTES/ $\text{Gd}_2\text{O}_3$ – $\text{Tb}_2\text{O}_3$  core to synthesize nano5, nano10, nano20 and nano50). There was a one hour delay between the two additions. After the last addition, the final mixture was stirred for 48 h at 40 °C.

Direct measurements of the size distribution of the nanoparticles were performed using photon correlation spectroscopy with Zetasizer NanoZS90 (He–Ne red laser 633 nm, 50 mW) (Malvern Instrument). Size measurements were carried out in deionized water with the colloids after purification by dialysis.

## 2.2. Photophysical properties

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda 2, Courtaboeuf, France) UV-visible spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a SPEX Fluorolog-3 spectrofluorimeter (Jobin & Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermo stated cell compartment (25 °C), using a 450 W xenon lamp. Fluorescence quantum yields ( $\Phi_f$ ) were determined using a tetraphenyl porphyrin solution as a fluorescence standard ( $\Phi_f = 0.11$ , in toluene, taking into account solvent refractive index and

absorption efficiencies).<sup>12</sup> For the direct determination of  $^1\text{O}_2$  quantum yield ( $\Phi_\Delta$ ) excitation occurred with a Xe-arc, the light was separated in a SPEX 1680, 0.22  $\mu$ m double monochromator. The detection at 1270 nm was carried out through a PTI S/N 1565 monochromator, and the emission was monitored by a liquid nitrogen-cooled Ge-detector model (EO-817L, North Coast Scientific Co.). Rose Bengal was chosen as a reference solution thanks to its high  $^1\text{O}_2$  quantum yield in EtOH ( $\Phi_\Delta = 0.68^{13}$ ). The absorbance value at the excitation wavelength (414 nm) of both the reference (Rose Bengal) and the nanoparticles solutions were set to around 0.2 by dilution.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Experimental results

We synthesized silica nanoparticles with different amounts of covalently bound photosensitizers. We added a carboxylic tetraphenyl chlorin that had previously been activated with a NHS group to aminopropyltriethoxysilane (APTES) to prepare the TPC–APTES precursor. The precursor was added in the first step in addition to the other silane precursors to the  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ – $\text{Tb}_2\text{O}_3$  (50 : 50) NPs. By modulating the quantity of TPC–APTES, we synthesized nanoparticles with theoretically 5, 10, 20 or 50 equivalents of TPC by NP (called respectively nano5, nano10, nano20, nano50). Because the coupling was not total, the number of PS units coupled to the nanoparticles was estimated by comparing the absorption at 420 nm of the TPC coupled to the NP to an absorption calibration curve of the TPC in solution. For each NP (nano5, nano10, nano20, nano50), the coupling of the PS was around 30%. The hydrodynamic radius was estimated by PCS on the nanoparticles with no PS because of the interaction between the PS (absorption at 633 nm) and the laser used to determine the size of the particles. The same manipulations on nanoparticles performed with a fluorescein fluorophore (with no absorption at 633 nm) were found to lead to only negligible diameter variations. A diagram summing up the reaction is given in Fig. 1.

We compared the photophysical properties of the TPC coupled to nano5, nano10, nano20 and nano50 for the same concentration of nanoparticles in a solution. The absorption spectra of TPC in the NPs are presented in Fig. 2.

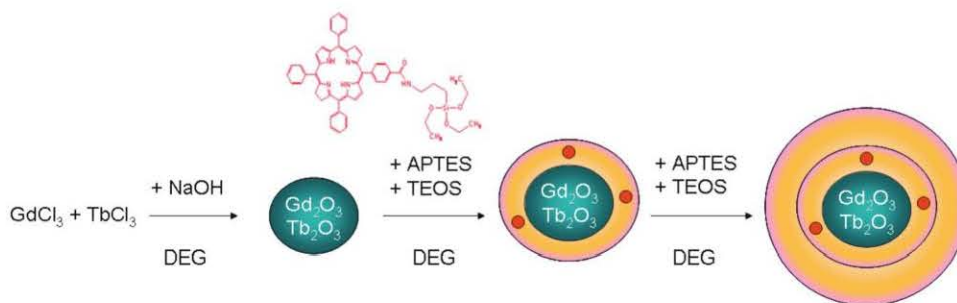
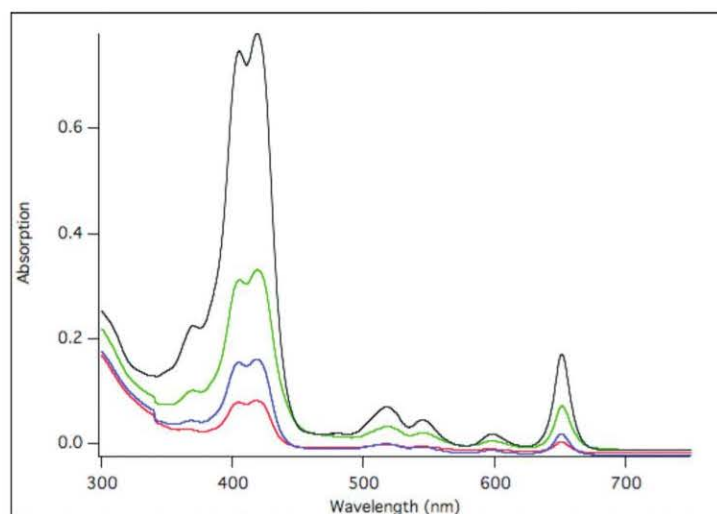
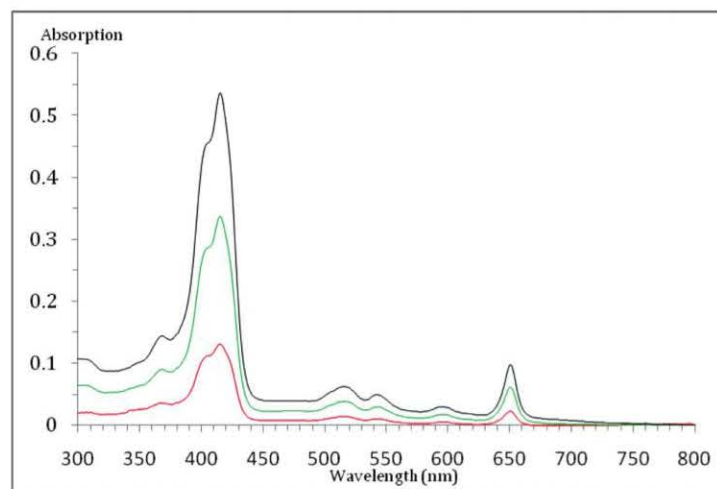


Fig. 1 Diagram of the reaction.



**Fig. 2** Absorption spectra of TPC covalently coupled to a same concentration of nanoparticles in ethanol (red: nano5, blue: nano10, green: nano20, black: nano50).



**Fig. 3** Absorption spectra of TPC in ethanol (red:  $7.7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , green:  $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , black:  $3.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ).

They consist of one strong absorption peak caused by  $S_0 \rightarrow S_{n>2}$  (B or Soret band) transitions closed to 420 nm. Besides Soret band, four weak Q bands caused by two  $S_0 \rightarrow S_1$  ( $Q_x$  bands) and two  $S_0 \rightarrow S_2$  ( $Q_y$  bands) transitions are observed between 500 and 650 nm. The intensity ratio of these four Q-bands shows an ethio type spectrum. The absorption spectrum exhibits a minimal light scattering contribution, thanks to the small size of the nano-objects (Rayleigh and/or Mie scattering). The UV-visible spectra are composed of light absorption due to the chlorin chromophore as well as an absorption associated

with the GdTb core of the nanoparticle, around 300 nm. Increasing the concentration of TPC into the nanoparticles was not found to induce any apparent change in the shape and any shift of the UV-visible spectra. The same phenomenon is observed for free TPC in solution – the increase of the concentration has no effect on the shape of UV-visible spectrum in this concentration range (Fig. 3).

As expected, Fig. 4 shows that the absorption at 420 nm of TPC in nano5, nano10, nano20 or nano50 is proportional to the concentration of TPC into the nanoparticles.

The shapes of the fluorescence spectra of free TPC and TPC coupled to the nanoparticles are similar and the maximum  $S_{1,0} \rightarrow S_{0,0}$  is detected at 650 nm (Fig. 5). Another small band can be observed at 720 nm as already shown previously.<sup>14</sup>

Fig. 6 shows the fluorescence intensity according to the TPC concentration for TPC in solution or coupled to the nanoparticles. The fluorescence emission of TPC in solution was proportional to the absorbance at low concentration (no skin effect) but the fluorescence intensity of the TPC coupled to the NP was found to decrease when the concentration of TPC increased.

We measured the formation of singlet oxygen by recording direct luminescence of  $^1O_2$  after excitation of the TPC at 414 nm (Fig. 7).

While the  $^1O_2$  formation of TPC in solution was proportional to the absorption at low concentration (no skin effect), the  $^1O_2$  formation of the TPC coupled to the nanoparticles decreased when the concentration of TPC increased (Fig. 8).

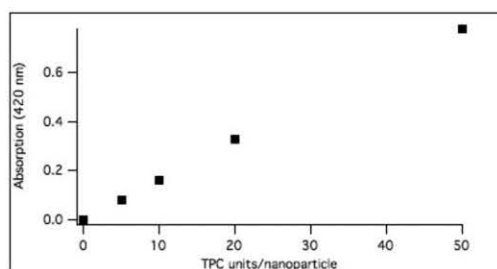


Fig. 4 TPC absorption at 420 nm in ethanol of nano5, nano10, nano20, nano50 (number of units per nanoparticle based on the synthesis, same concentration).

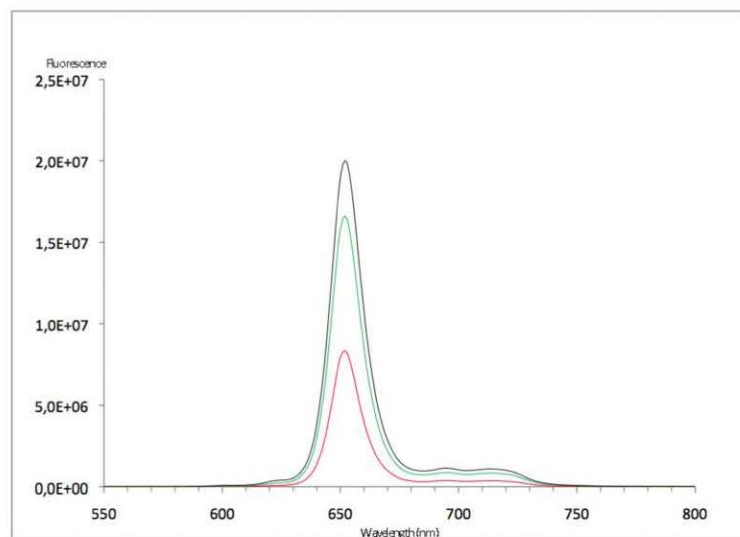


Fig. 5 Fluorescence spectra of TPC in ethanol (red:  $7.7 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, green:  $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, black:  $3.2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>).

These results suggest there was a quenching due to the increasing concentration of TPC units into the nanoparticles. In order to explain the results, different phenomenon could be taken into account:

- The formation of a complex in the ground state. Since the UV spectra apparently do not change, this hypothesis should be not retained.

- A quenching by an inhibitor present in the bulk. The effect has to be independent from the number ( $n$ ) of the photosensitizers units coupled to the nanoparticle.

- Long-distance energy transfer such as FRET: if this mechanism were to occur alone, there would be only a delocalization of electronic energy onto the photosensitizers without in principle, a loss of energy. At the same time, the yield of  $^1O_2$  production will probably be improved if a non-stationary diffusion controlled reaction between the TPC singlet state and oxygen occurs.<sup>15</sup> This was not observed experimentally.

- Both long-distance energy transfer such as FRET and a quenching process. If we suppose that the photosensitizer is localized in close proximity to a quencher Q, the diffusion at molecular scale of the electronic energy to the quenching site could result in a decrease of fluorescence.

### 3.2. Simplified model

To validate the kinetics results, we developed a simplified model based on the following assumptions:

- All the nanoparticles are mono disperse (no light dispersion).

- For a given concentration of PS, the number of PS is identical in each monodisperse nanoparticle.

- The distribution of the photosensitizer is assumed to be homogenous into each NP.



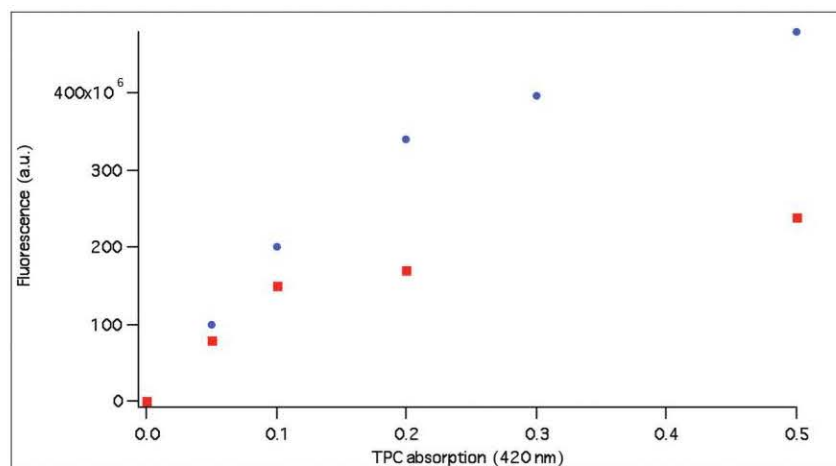


Fig. 6 Fluorescence intensity in function of the TPC concentration of free TPC (blue) and of TPC covalently coupled to the nanoparticles (red).

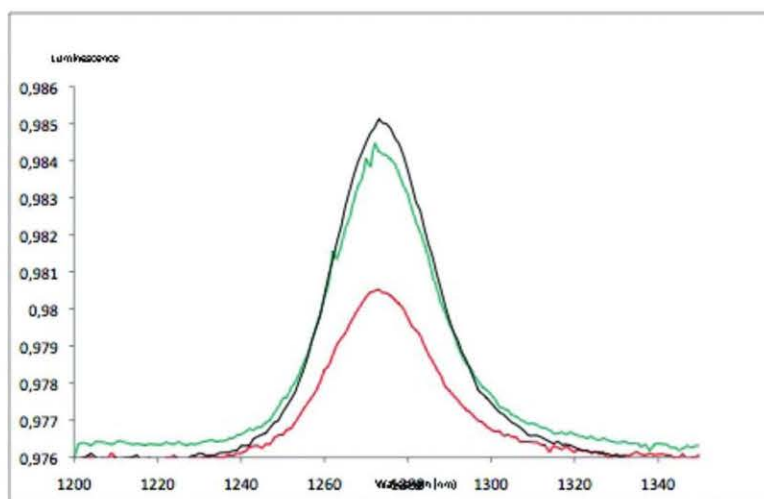
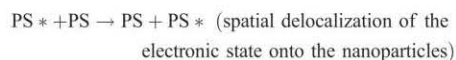


Fig. 7 Singlet oxygen formation of TPC in ethanol (red:  $7.7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , green:  $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , black:  $3.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 414 \text{ nm}$ ).

It is then possible to write:



Taking into account the possible long-distance energy transfer (Förster mechanism), when the number of covalently grafted PS increases in the nanoparticles the average distance between two

PS decreases. It might be possible that for distances closer to the Förster distance  $R_0$  electronic energy transfer could move the energy around the particles (Fig. 9). The photosensitizer's  $S_1$  electronic state created at time  $t = 0$  can migrate from one position to another  $\text{PS}_1^*$ ,  $\text{PS}_2^*$ ,  $\text{PS}_3^*$ , etc.

If no other quenching occurs, the lifetime of the PS must be constant and independent of the number of PS per nanoparticle. This theoretical hypothesis has not been tested by experiments. Nevertheless, the value  $R_0$  has been determined by absorption and emission spectroscopies and is of the order of magnitude of 50 Å, which is larger than the diameter of the nanoparticle. In this respect, Förster energy transfer seems to be a possible mechanism for energy delocalization onto the nanoparticle.



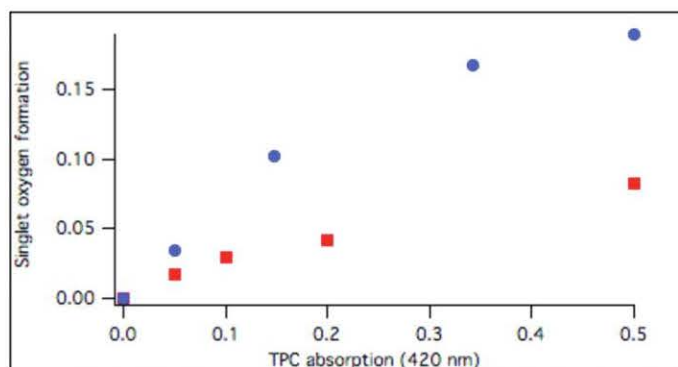


Fig. 8 Singlet oxygen luminescence intensity in function of the TPC concentration of free TPC (blue) and of TPC covalently coupled to the nanoparticles (red).

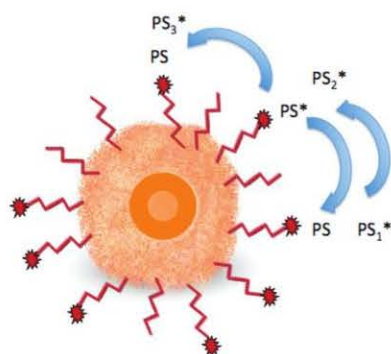


Fig. 9 Schematic of structure and mechanism of action of quenching in the nanoparticles.

Following on from the above comment, if a quencher Q is present on the surface of the particle (Fig. 9) the migration of the electronic energy may induce the formation of an excited PS\* close to a quencher, leading to the observed quenching. The simple modeling presented here is defined by assuming the following statements:

- The energy transfer between PS\* and PS in the ground state with a rate defined by Förster mechanism.
- Static quenching when a PS\* is located to a quencher Q.
- Regarding the transport process of the electronic energy (PS\*<sub>i</sub> → PS\*<sub>i+1</sub>) as close to the conceptual vision of a diffusion-controlled process (random displacements of the electronic energy) leading to a classical rate constant of reactions defined by:<sup>16</sup>

$$k_Q = \alpha\pi N\sigma D \quad (1)$$

where  $\sigma$  is the collision distance between the donor and the acceptor,  $\alpha$  is a coefficient relative to the space for the reaction (4 for a spherical symmetry, 2 for a spherical surface, etc.).

It is possible to define the apparent inhibition quenching rate constant with such a diffusion process of electronic energy transfer (effective in absence of molecular transfer) using the following data:

- Surface of the nanoparticle:  $4\pi r^2$ .
- The average surface occupied by a single photosensitizer:  $4\pi r^2/n$  with  $n$  being the number of PS per nanoparticle.
- The average distance between 2 photosensitizers:

$$R = 2\sqrt{(4\pi r^2/n)} = 4r\sqrt{(\pi/n)} \quad (2)$$

- The rate constant  $k$  of a Förster type energy transfer process is

$$k = k_0(R_0/R)^6 \quad (3)$$

where  $R_0$  is the classical Förster distance.

By analogy, the apparent  $D$  electronic energy “diffusion” coefficient is:

$$D = R^2 k \quad (4)$$

From (1) and (4),

$$k_Q = \alpha\pi N\sigma R^2 k \quad (5)$$

From (3) and (5),  $\sigma = R$ :

$$k_Q = \alpha\pi N \times R \times R^2 \times k_0(R_0/R)^6 = \alpha\pi N k_0 R_0^6 R^{-3} \quad (6)$$

$$k_Q = KR^{-3} \quad (6)$$

with  $K = \alpha\pi N k_0 R_0^6$ .

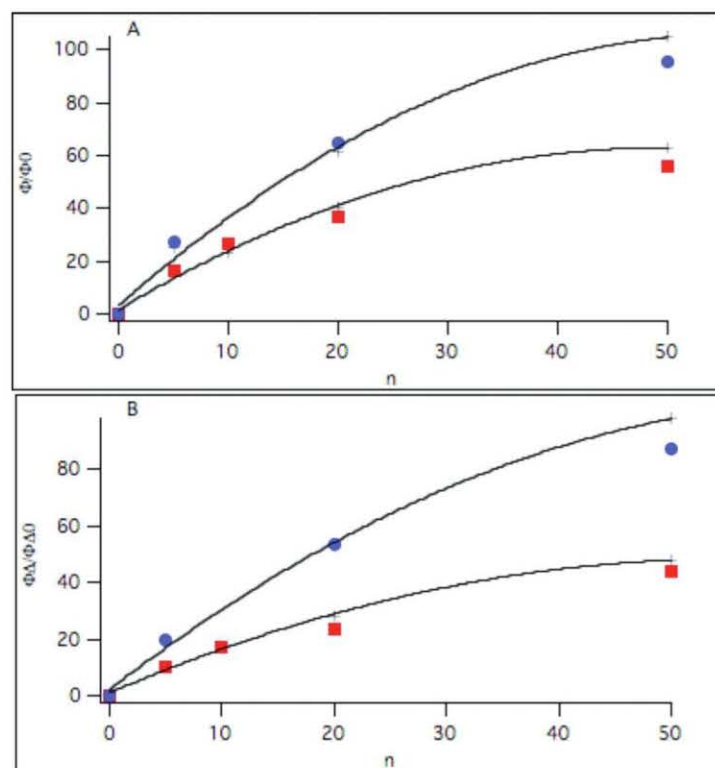
And finally from (6) and (2),

$$k_Q = K(4r\sqrt{(\pi/n)})^{-3} = K'n^{-3/2} \quad (7)$$

with  $K' = K*(4r*\sqrt{(\pi)})^{-3}$ .

The fluorescence quantum yield ( $\Phi_f$ ) can be written as (Stern-Volmer plots):

$$\Phi_0/\Phi_f = 1 + k_{QT_N}[Q] \quad (8)$$



**Fig. 10** (A)  $\Phi_0/\Phi_f$  in function of  $n$ . (B)  $\Phi_{\Delta 0}/\Phi_{\Delta}$  in function of  $n$ . Experimental data in red: TPC coupled to the nanoparticles, blue: TPC in solution. Black: fitting using a least square simplified techniques.

where  $\Phi_0$  is the fluorescence quantum yield without any quencher,  $\tau_N$  is the natural fluorescence lifetime of the photosensitizer. From a hypothetical standpoint, if the light absorbed by a photosensitizer is independent of the distance to the quencher  $Q$ , at  $t = 0$ , the light is uniformly distributed around the quencher  $Q$ . From (7) and (8),

$$\Phi_0/\Phi_f = 1 + K'\tau_N n^{3/2}[Q]$$

with  $K' = K(4r\sqrt{\pi})^{-3}$ .

In Fig. 10, after a classical fitting using a simplified least-square technique we reported  $\Phi_0/\Phi_f$  and  $\Phi_{\Delta 0}/\Phi_{\Delta}$  in function of  $n$ .

This experimental data complies with our proposed model. At the same time, we showed that  $^1O_2$  production evolved in the same manner. Fluorescence emission and  $^1O_2$  production have in this respect the same origin.

Both our fluorescence experiments and formation using a classical model for the definition of the skin effect on the analyzed signal showed that, for the highest concentrations of PS, the calculated curve is always located at lower values than the experimental ones. Independently of the quality of the measurements, this result is possibly explained by an effect of some self-

quenching induced by the formation of dimers in the ground state.

### 3.3. Discussion

Most conventional photosensitizers form aggregates due to their  $\pi$ - $\pi$  interactions and hydrophobic characteristics resulting in significant reduction of singlet oxygen by self-quenching. Indeed, aggregation shortens the triplet-state lifetime and decreases the singlet oxygen quantum yield by dissipating energy through internal conversion.<sup>17-19</sup> However, this property has been used by different research teams to target singlet oxygen formation given that aggregated PSs are non-toxic and become phototoxic when released in their monomeric form. These carrier systems have a switching phototoxicity. For example, McCarthy *et al.*<sup>20</sup> showed that some aggregated PSs loaded in biodegradable nanoparticles are stable and non-phototoxic upon systemic administration. Upon cellular internalization, the PS is released from the nanoparticle and becomes highly phototoxic. Other teams have developed smart and complex molecules that can be activated in the presence of enzymes that are specific to cancer cells, tumour medium or metastatic activity.<sup>21-24</sup>

As we previously described, non-biodegradable nanoparticles also seem to be a very promising option satisfying all the



requirements for an ideal targeted PDT and can be used to improve the targeting of the photosensitizer.<sup>5,6</sup> It has been suggested that hybrid gadolinium oxide nanoparticles could be useful for magnetic resonance imaging (MRI) and treatment.<sup>7–9</sup> Their small size (less than 50 nm of diameter), their silica shell that allows the covalent coupling of a photosensitizer, and their polyethylene glycol (PEG) grafting that allows the covalent coupling of peptide units all make them an ideal nanopatform for both imaging and PDT.

In these nanoparticles, the PS is covalently coupled to the NP. To be efficient, it is essential that photosensitizers keep their photophysical properties after their covalent coupling to the NP. In a first study<sup>10</sup> we proved that it was possible to elaborate multifunctional nanoparticles that present photodynamic activity. Using the fluorescence of the photosensitizer, we could estimate that each nanoparticle contains around 6 chlorin molecules. The signature phosphorescence emission of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> at 1270 nm was clearly observed. We could also observe a very low decrease in the NP fluorescence emission and singlet oxygen emission indicated that the photosensitizer molecules linked into the silica matrix were slightly affected by the microenvironment.

To develop the most appropriate nanoparticles for effective PDT applications, in this study we looked at the influence of the number of PS grafted onto the nanoparticles on the photophysical properties. Indeed, the multigrafting of PS onto a nanoparticle can create a ground state complex such as dimers. In this respect, according to previous works in this field, when an excited PS transfer its electronic energy into such a weak complex a non-reversible energy transfer will occur leading to lose a part of the electronic energy and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> production. Basic understanding of dye aggregation on a nanoparticle surface as well as the excited state interaction with a semiconductor support was studied by Barazzouk *et al.*<sup>25</sup> They investigated the photoelectrochemical properties of carbocyanine dyes adsorbed on SnO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> surfaces. The authors observed a blue shift in the absorption maximum upon adsorption of the dye molecules on SnO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> colloids surfaces, supporting the argument that monomer and aggregates forms of dye were in equilibrium. They proved that the binding of cyanine dye molecules to SnO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> colloid surfaces induced intermolecular interactions leading to an aggregation effect, and the blue shift in absorption bands confirmed the dye aggregation to be of H-type.

More recently, Rossi's team developed protoporphyrin IX nanoparticle carriers, and studied the photophysical properties of this well-known photosensitizer.<sup>26</sup> They synthesized an organosilane protoporphyrin IX and coupled it to a nanoparticle-based system. Firstly, a red shift of the Soret band of silyl-functionalized PpIX compared to PpIX was observed and the authors suggested this was due to a decrease in aggregation. The absorption spectra corresponding to the Soret and the Q bands in the porphyrin absorption spectrum were also observed in a suspension of PpIX-loaded silica spheres, although the bands were overlapped by the light scattering of solid particles (mean particle diameter 77 ± 12 nm). Emission bands of the PpIX-loaded silica particles in aqueous solution were slightly shifted to the blue region as compared to the emission spectrum of silyl-PpIX free in aqueous solution. Generation of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> was more efficient for the PpIX encapsulated than for the free PpIX. This was

attributed to a decrease in the monomer–dimer equilibrium because the porphyrin is covalently attached to the silica matrix, while in solution this kind of equilibrium is possible leading to a decrease of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quantum yield. Based on these promising results, the same team recently published a paper about silica gel nanoparticles containing phenothiazine photosensitizer with specific ratios of dimer to monomer species (methylene blue and thionin).<sup>27</sup> By recording the absorption spectra, the authors could estimate the ratio dimer–monomer. As expected, they observed a decreasing amount of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generation with a decrease of the dimer–monomer ratios.

In our study, we synthesized nanoparticles coupled with different amount of PSs with an estimated coupling yield of 30%. For obvious topological reasons, it seems difficult to increase the number of PS units on each nanoparticle after a certain limit. Whereas the absorption spectra of the photosensitizer were not affected by an increase of the chlorin concentration, both fluorescence emission and singlet oxygen emission were found to decrease when the concentration of covalently linked PSs increased. The decrease of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quantum yield has been observed by other authors,<sup>28,29</sup> suggesting that this may be due to indirect effects such as the scattering of the nanoparticles, the local sequestration of generated <sup>1</sup>O<sub>2</sub> by the NP matrix or by intrinsic lower encapsulated photosensitizer <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quantum yield. Since the nanoparticles are the same size, and the polysiloxane is the same matrix, these hypotheses do not appear to be true according to our system. By elaborating a model to interpret this phenomenon, we would rather suggest the influence of both long distance energy transfer such as FRET and inhibition by PS ground state dimer. From an application standpoint, increasing the concentration of grafted TPC into the nanoparticles leads to a quenching effect of fluorescence and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> luminescence.

#### 4. Conclusion

Covalent coupling of photosensitizers into nanoparticles offer a real advantage for PDT applications given that the photosensitizers cannot, in practise, be released from the nanoparticles and are protected from their environment. The grafting of a large number of PS onto a nanoparticle may still therefore be considered a highly interesting option for cancer treatment through PDT. Nevertheless, our work proved that the amount of covalently grafted PS has a slightly negative influence on the fluorescence and singlet oxygen quantum yields. If the payload is too high, this may result in a decrease of singlet oxygen quantum yield due to FRET associated with partial quenching linked to the formation of dimers.

#### Abbreviations

APTES	Aminopropyltriethoxysilane
Ce6	Chlorin e6
DEG	Diethyleneglycol
DMSO	Dimethylsulfoxide
FRET	Förster resonance energy transfer
$\Phi_F$	Fluorescence quantum yield
$\Phi_\Delta$	Singlet oxygen quantum yield
MRI	Magnetic resonance imaging

NHS	<i>N</i> -Hydroxy succinimic ester
PDT	Photodynamic therapy
PEG	Polyethylene glycol
PS	Photosensitizer
Q	Quencher
ROS	Reactive oxygen species
TEA	Triethylamine
TEOS	Tetraethoxysilane
TPC	5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin

## References

- R. K. Pandey and G. Zhang, *Porphyrim Handbook*, ed. K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, Academic Press, San Diego, CA, 2000.
- I. J. MacDonald and T. J. Dougherty, Basic principles of photodynamic therapy, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2001, **5**, 105–129.
- K. R. Weishaupt, C. J. Gomer and T. J. Dougherty, Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo inactivation of a murine tumor, *Cancer Res.*, 1976, **36**, 2326–2329.
- J. B. Mitchell, S. McPherson and W. DeGraff, Oxygen dependence of hematoporphyrin derivative-induced photoinactivation of Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 1985, **45**, 2008–2011.
- D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M. L. Viriot, F. Guillemain and M. Barberi-Heyob, Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents, *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**, 612–621.
- D. Brevet, M. Gary-Bobo, L. Raehm, S. Richeter, O. Hocine, K. Amro, B. Loock, P. Couleaud, C. Frochot, A. Morère, P. Maillard, M. Garcia and J. O. Durand, Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy, *Chem. Commun.*, 2009, 1475–1477.
- J. L. Bridot, A. C. Faure, S. Laurent, C. Rivière, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Jossierand, J. L. Coll, L. Vander Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat and O. Tillement, Hybrid gadolinium oxide nanoparticles Multimodal contrast agents for in vivo imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 5076–5084.
- A. C. Faure, S. Dufort, V. Jossierand, P. Perriat, J. L. Coll, S. Roux and O. Tillement, Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coating, *Small*, 2009, **5**, 2565–2575.
- A. C. Faure, C. Hoffmann, R. Bazzi, F. Goubard, E. Pauthe, C. A. Marquette, L. J. Blum, S. Roux and O. Tillement, Functionalization of luminescent aminated particles for facile bioconjugation, *ACS Nano*, 2008, **2**, 2273–2282.
- P. Couleaud, D. Bechet, R. Vanderesse, M. Barberi-Heyob, A. C. Faure, S. Roux, O. Tillement, S. Porhel, F. Guillemain and C. Frochot, Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy, *Nanomedicine*, 2011, **6**, 995–1009.
- R. Bonnett, *Chemical Aspect of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science Publisher, 2000.
- T. L. C. Figueiredo, R. A. W. Johnstone, A. M. P. Sant'Ana Sørensen, D. Burget and P. Jacques, Determination of fluorescence yields, singlet lifetimes and singlet oxygen yields of water-insoluble porphyrins and metalloporphyrins in organic solvents and in aqueous media, *Photochem. Photobiol.*, 1999, **69**, 517–528.
- M. C. Derosa and R. J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **233–234**, 351–371.
- L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M. L. Viriot, F. Guillemain and M. Barberi-Heyob, A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells, *J. Controlled Release*, 2006, **111**, 153–164.
- W. Dong and J. C. André, Diffusion-controlled reactions. II. An approach based on generalized diffusion equation, *J. Chem. Phys.*, 1994, **101**, 299–306.
- J. Perrin, Mouvement brownien et réalité moléculaire, *Ann. Chim. Phys.*, 1909, **19**, 5–104.
- L. E. Bennett, K. P. Ghiggino and R. W. Henderson, Singlet oxygen formation in monomeric and aggregated porphyrin c, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1989, **3**, 81–89.
- X. Damoiseau, H. J. Schuitmaker, J. W. M. Lagerberg and M. Hoebeke, Increase of the photosensitizing efficiency of the Bacteriochlorin a by liposome-incorporation, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2001, **60**, 50–60.
- M. R. Hamblin, J. L. Miller, I. Rizvi and B. Ortel, Degree of substitution of chlorin(e6) conjugated to charged poly-L-lysine chains affects their cellular uptake, localization and phototoxicity towards macrophages and cancer cells, *J. XRay Sci. Tech.*, 2002, **10**, 139–152.
- J. R. McCarthy, J. M. Perez, C. Brückner and R. Weissleder, Polymeric nanoparticle preparation that eradicate tumors, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 2552–2556.
- M. Verhille, P. Couleaud, R. Vanderesse, M. Barberi-Heyob and C. Frochot, Modulation of photosensitization processes for an improved targeted photodynamic therapy, *Curr. Med. Chem.*, 2010, **17**, 3925–43.
- Y. Choi, R. Weissleder and C. H. Tung, Selective antitumor effect of novel protease-mediated photodynamic agent, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 7225–7229.
- M. A. Campo, D. Gabriel, P. Kucera, R. Gurny and N. Lange, Polymeric photosensitizer prodrugs for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, 2007, **83**, 958–965.
- D. Gabriel, M. F. Zuluaga, M. N. Martinez, M. A. Campo and N. Lange, Urokinaseplasminogen sensitive polymeric photosensitizer prodrugs: Design, synthesis and in vitro evaluation, *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, 2009, **19**, 15–24.
- S. Barazzouk, H. Lee, S. Hotchandani and P. V. Kamat, Photosensitization aspects of Pinacyanol H-aggregates. Charge injection from singlet and Triplet states into SnO<sub>2</sub> Nanocrystallites, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 3616–3623.
- L. M. Rossi, P. R. Silva, L. L. R. Vono, A. U. Fernandes, D. B. Tada and M. S. Baptista, Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: preparation, optical properties and singlet oxygen generation, *Langmuir*, 2008, **24**, 12534–12538.
- D. B. Tada, L. M. Rossi, C. A. P. Leite, R. Itri and M. S. Baptista, Nanoparticle Platform to modulate reaction mechanism of phenothiazine photosensitizers, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2010, **10**, 1–9.
- F. Liu, X. Zhou, Z. Chen, P. Huang, X. Wang and Y. Zhou, Preparation of purpurin-18 loaded magnetic nanocarriers in cottonseed oil for photodynamic therapy, *Mater. Lett.*, 2008, **62**, 2844–2847.
- D. B. Tada, L. L. R. Vono, E. L. Duarte, R. Itri, P. K. Kiyohara, M. S. Baptista and L. M. Rossi, Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: A potential magnetic carrier for photodynamic therapy, *Langmuir*, 2007, **23**, 8194–8199.



## II. 2. c. v. Le peptide

### • Généralités sur les peptides

Un peptide est un assemblage de plusieurs acides aminés (A.A) liés les uns les autres par des liaisons peptidiques (liaisons amides). Les peptides sont des molécules constituées de moins de 50 acides aminés qui ne possèdent pas de structure tertiaire, contrairement aux protéines <sup>[345]</sup>. Un acide aminé est, dans son type le plus simple, une molécule chirale constituée d'un carbone alpha asymétrique ( $C_\alpha$ ) de géométrie tétraédrique lié par une liaison covalente à un groupement amine et à un groupe carboxylique <sup>[346]</sup> (Figure 139). Ce carbone  $\alpha$  permet deux configurations non identiques (isomères) appelés énantiomères. Ces isomères d'un même A.A peuvent être dextrogyre (+) ou lévogyre (-) suivant le sens de déviation de la lumière polarisée qui leur est appliquée par rapport au plan de la molécule (respectivement : sens horaire/sens antihoraire) (Figure 140). Les acides aminés, comme toutes les molécules, possèdent une configuration absolue R (D) ou S (L) qui correspond à la nomenclature CIP (Cahn-Ingold et Prelog). La majorité des acides aminés naturels possèdent la configuration L mais il est possible de trouver quelques acides aminés de configuration D <sup>[333]</sup>.

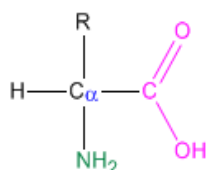


Figure 139 : Représentation de Fisher, d'après la référence [346].

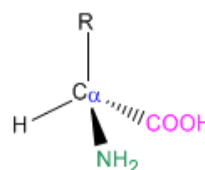


Figure 140 : Représentation de Cram, d'après la référence [346].

### • La synthèse peptidique sur support solide ou SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis)

L'un des pionniers de la synthèse peptidique sur phase solide est Merrifield. En 1963, il a obtenu un tétrapeptide (*L*-(Leu-Ala-Gly-Val)) qu'il a ensuite purifié à l'aide d'une colonne chromatographique <sup>[347]</sup>. Cette méthode consiste à faire croître une chaîne d'A.A à partir d'une résine insoluble (généralement du polystyrène <sup>[346]</sup>) portant l'acide aminé *N*-terminal protégé, par couplages successifs de chaque A.A. Chaque étape de couplage est suivie d'une agitation qui permet d'homogénéiser le mélange « résine-peptide + acide aminé à coupler » puis un lavage est effectué après la déprotection de la fonction  $NH_2$  terminale avant de recommencer un cycle de couplage. Cette méthode présente les avantages d'être rapide et de garder le peptide en croissance accroché à la résine. Cependant, bien que des excès de réactifs et de catalyseurs soient utilisés, tous les peptides synthétisés ne correspondent pas au produit désiré du fait des délétions engendrées par des couplages non quantitatifs. Pour limiter la formation des sous-produits indésirables, une étape supplémentaire de *capping* des fonctions  $NH_2$  est effectuée après chaque couplage. Il s'agit ici de faire réagir de l'anhydride acétique avec la fonction  $NH_2$  libre de l'acide aminé précédent (déprotégé à la pipéridine) qui n'aurait pas réagi avec l'acide aminé suivant. Cette étape stoppe définitivement la croissance des peptides délétères en un acide aminé et permet de limiter le nombre de sous-produits formés.

Pour les couplages difficiles entre acides aminés, il est possible d'utiliser la ninhydrine (test de Kaiser) qui permet de révéler la présence de fonctions amines libres par une coloration orange qui devient bleue en présence d'une amine libre. Un test similaire, au TNBSA (acide trinitrobenzènesulfonique) permet de vérifier si un couplage peptidique n'a pas été effectué. Dans ce cas, le réactif réagit avec les fonctions  $NH_2$  libres et prend une coloration jaune, orange ou rouge en fonction de l'acide aminé testé.

### • Les peptides du plan d'expérience (ATWLPPR et LWRPTPA)

Dans le plan d'expérience, les peptides utilisés sont de natures différentes (ATWLPPR ou LWRPTPA) et leurs quantités greffées par nanoparticule sont variables (0, 5 ou 10 peptides). Le peptide LWRPTPA nommé également « *scrambled* » contient les mêmes acides aminés que le peptide ATWLPPR ciblant NRP-1 mais dans un enchaînement différent, ce qui lui confère des charges électrostatiques analogues à celles du peptide ligand ATWLPPR <sup>[333]</sup> tout en ayant aucune affinité pour NRP-1, et cela jusqu'à une concentration de 1000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  <sup>[333]</sup> (Figure 141, Figure 142). De plus, des expériences de *docking*, effectuées à Nancy, sur l'affinité du peptide ATWLPPR pour NRP-1 ont montré l'affinité de ce motif peptidique pour le corécepteur au VEGF <sup>[348]</sup>.

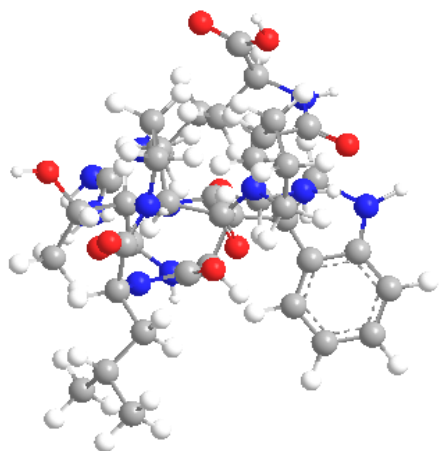


Figure 141 : Structure tridimensionnelle du peptide ligand ATWLPPR dessinée sous Chem3D.

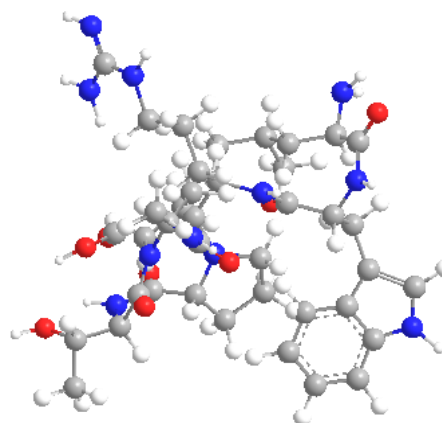


Figure 142 : Structure tridimensionnelle du peptide *scrambled* LWRPTPA dessinée sous Chem3D.

Les synthèses de peptides (protégés ou libres) ont été effectuées au LCPM sur un synthétiseur automatique programmable MultiPrep INTAVIS (Figure 146). La résine utilisée est placée dans des réacteurs fermés à leur base par un fritté. Ce polymère porte le premier acide aminé dont la concentration (charge) est définie en millimoles par gramme de résine. Les peptides synthétisés pendant cette thèse ont été obtenus par la stratégie Fmoc/tBu (fluorénylméthoxycarbonyl/tertiobutyle) (Figure 143) avec une résine 2-chlorotriptyle commerciale (Figure 144) sur laquelle est fixé le premier A.A (par son groupement carboxylique).

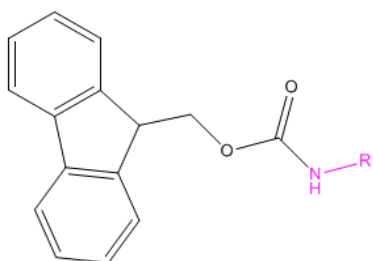


Figure 143 : Structure chimique du groupement protecteur Fmoc lié à un acide aminé.

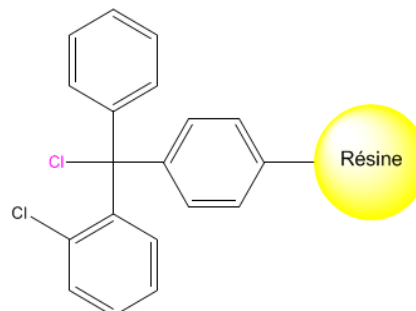
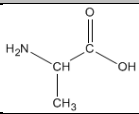
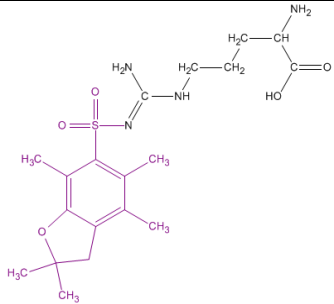
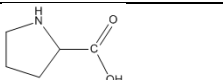
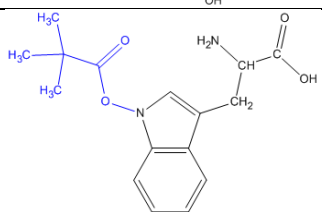
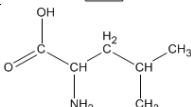
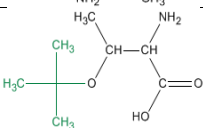


Figure 144 : Structure chimique de la résine « *chlorotriptyl chloride* », adaptée de la référence [18].

Pour s'assurer que la croissance du peptide se fasse par liaison entre les fonctions  $-\text{NH}_2$  de la chaîne en croissance et les fonctions  $-\text{COOH}$  du  $\text{C}_{\alpha}$ , les acides aminés commerciaux utilisés portent des protections

en position *N*-terminale et sur leurs chaînes latérales fonctionnelles. Ces protections orthogonales (semi-permanentes) (Tableau 12) sont choisies de façon à résister aux cycles successifs de « déprotection/activation/couplage » effectués lors de la synthèse.

Tableau 12 : Acides aminés utilisés pour synthétiser le peptide ATWLPPR protégé.

Nomenclature		Nom exact	Protection	Fonction protégée	Structure chimique de l'acide aminé
Ala	A	L-H-Ala-OH	-	-	
Arg(Pbf)	R	L-H-Arg(Pbf)-OH	2,2,4,6,7-pentméthyldihydro benzofuran-5-sulfonyle (Pbf)	guanidinium	
Pro	P	L-H-Pro-OH	-	-	
Trp(Boc)	W	L-H-Trp(Boc)-OH	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle (Boc)	amine indolique	
Leu	L	L-H-Leu-OH	-	-	
Thr(tBu)	T	L-H-Thr(tBu)-OH	tert-iobutyle (tBu)	alcool	

La liaison amide issue de la réaction entre la fonction acide carboxylique et la fonction amine n'étant pas spontanée, il est nécessaire d'activer la fonction carboxylique à l'aide du *O*-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (HBTU) après avoir neutralisé la fonction acide avec de la 4-méthylmorpholine (NMM) (Figure 145).



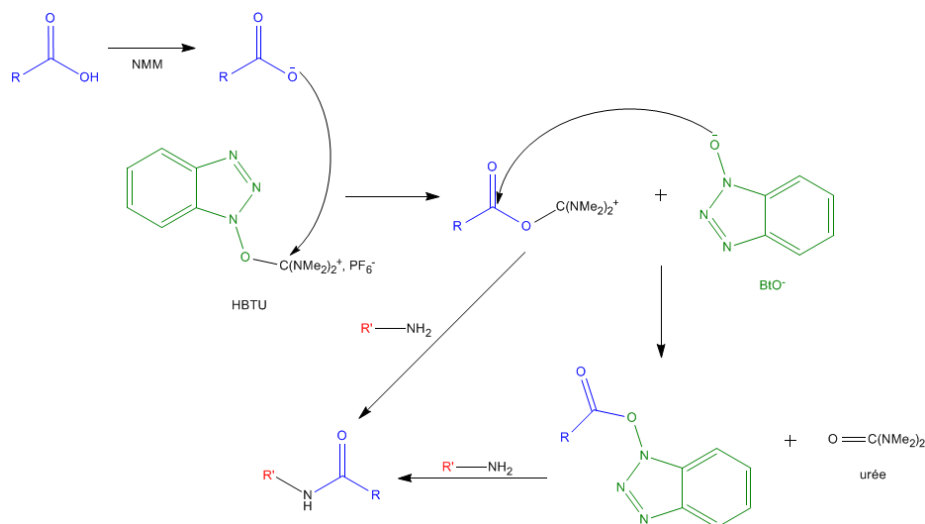


Figure 145 : Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés, par activation au HBTU.

Une fois synthétisé, le brut réactionnel est placé sous agitation pendant 2 heures avec un mélange de clivage (AcOH (acide acétique)/TFE (2,2,2-trifluoroéthanol)/DCM (dichlorométhane) : 2/2/6 : v/v/v) qui permet de libérer le peptide formé de la résine (Figure 146). Cette solution est ensuite récupérée et la résine est lavée avec environ 50 mL de DCM pour récupérer la totalité du brut réactionnel. Afin d'éliminer le TFE et l'AcOH, le DCM est évaporé à l'évaporateur rotatif à une température  $\leq 35^\circ\text{C}$ . Afin de faciliter l'élimination de l'AcOH, il est nécessaire d'ajouter de l'éther de pétrole (hexane) au brut réactionnel, ce qui permet de former un azéotrope entre l'hexane et l'AcOH (du DCM peut également être ajouté avant l'hexane pour faciliter la dissolution du brut de peptides). Le solide obtenu est ensuite redispersé dans l'eau, lyophilisé puis purifié par HPLC avec un gradient acétonitrile/eau en présence d'AcOH.

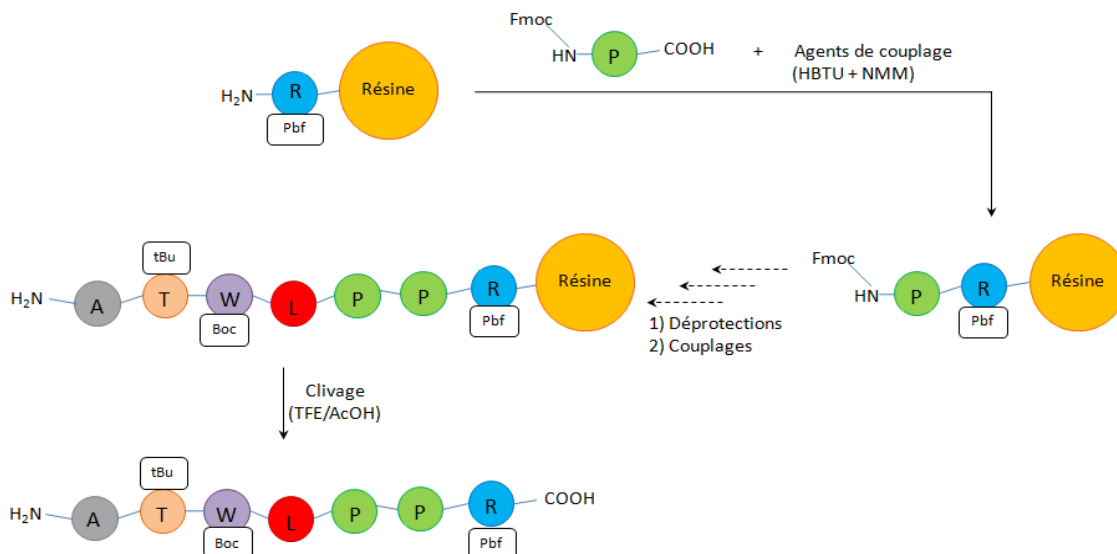


Figure 146 : Schéma récapitulatif de la synthèse et du clivage du peptide ATWLPPR protégé.

Cette synthèse a été utilisée pour obtenir le peptide ATWLPPR (Figure 147) et son *scrambled* (LWRPTPA) (Figure 148) sous leurs formes protégées et sous leurs formes libres. Dans le cas des peptides libres, la résine utilisée est une résine Wang sur laquelle est greffé le premier acide aminé protégé par un Fmoc

(groupe fluorénylméthoxycarbonyl). La présence du groupement Fmoc nécessite une déprotection préalable par une solution à 20% de pipéridine dans la DMF (diméthylformamide).

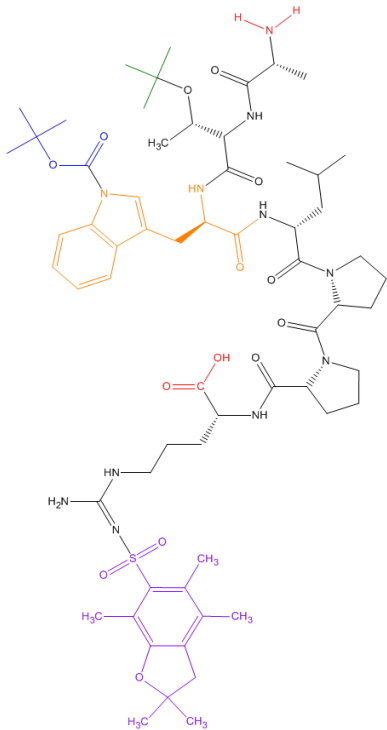


Figure 147 : Structure chimique du peptide ATWLPPR protégé (le tryptophane est indiqué en orange).

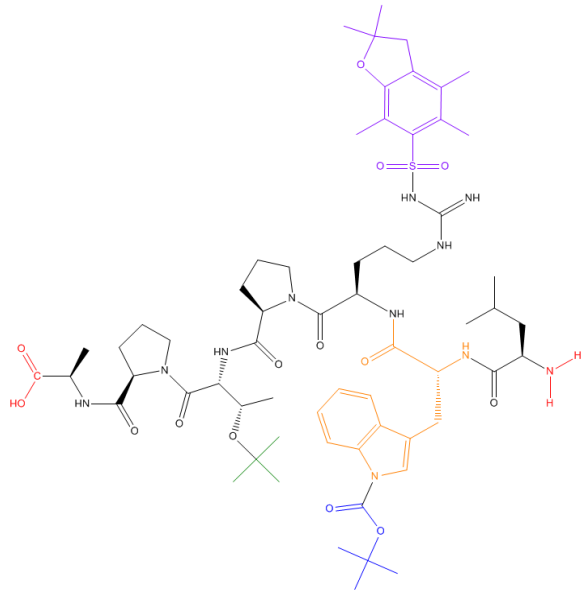


Figure 148 : Structure chimique du peptide LWRPTPA protégé (le tryptophane est indiqué en orange).

### • Propriétés photophysiques des peptides

Il existe un nombre restreint d'acides aminés pouvant fluorescer après excitation dans le domaine UV-visible (Tableau 13).

Tableau 13 : Longueurs d'onde d'absorption et de fluorescence et rendements quantiques des A.A fluorescents dans l'eau, d'après les références [349, 350].

Acide aminé	Longueur d'onde (nm)		Rendement quantique de fluorescence
	Absorption	Emission	
Phénylalanine	257	282	0,04
Tyrosine	274	303	0,21
Tryptophane	280	348	0,20

Grâce à la présence du tryptophane (W) dans la séquence peptidique, il est possible de les détecter par fluorescence ( $\lambda_{\text{émi}} \approx 350 \text{ nm}$ ) après leur excitation à 280 nm (Figure 149, Figure 150).

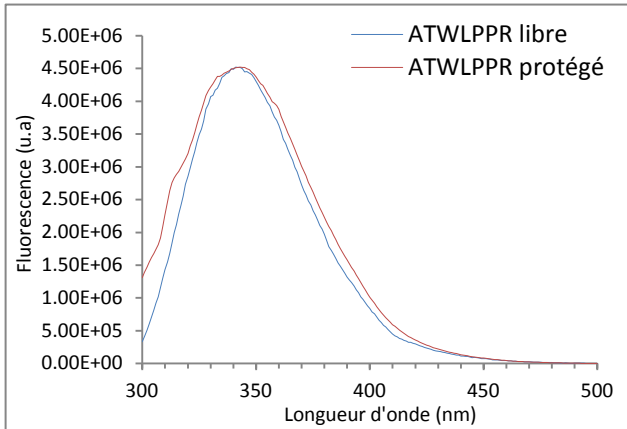


Figure 149 : Spectres de fluorescence du peptide ATWLPPR sous sa forme protégée et sous sa forme libre dans l'EtOH, excité à 280 nm.

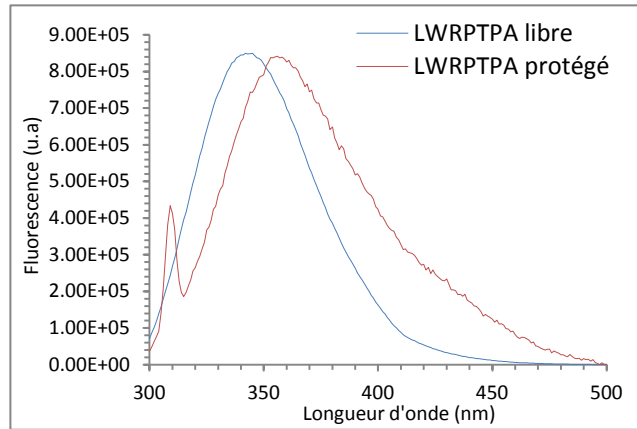


Figure 150 : Spectres de fluorescence du peptide LWRPTPA sous sa forme protégée et sous sa forme libre dans l'EtOH, excité à 280 nm.

## II. 2. c. vi. Synthèse des différents lots du plan d'expérience

Les lots de nanoparticules utilisés dans ce plan d'expérience possèdent tous les mêmes composants chimiques mais dans des proportions variables. Bien que les nanoparticules possèdent toutes la même structure générale, chaque lot est unique du point de vue de sa composition structurale.

Les cœurs d'oxydes de gadolinium utilisés correspondent à ceux mentionnés précédemment (GC, PC). L'enrobage à  $n$  Silicium par gadolinium signifie, que pour la synthèse de la couche de polysiloxane,  $n$  moles de précurseur silané (en équivalents de silice) ont été ajoutées par mole de gadolinium. Il en va de même en ce qui concerne la TPC, où  $n'$  moles de TPC ont été ajoutées en solution lors de la formation de la couche polysiloxane. Enfin, en ce qui concerne le greffage du peptide à la surface de la nanoparticule, L (ligand) et S (*scambled*) correspondent respectivement aux peptides ATWLPPR et LWRPTPA tandis que le chiffre qu'il leur est associé correspond au nombre théorique de peptides que l'on souhaite greffer par nanoparticule (Tableau 14).

Tableau 14 : Caractéristiques de nanoparticules synthétisées dans le plan d'expérience.

Lot	Caractéristiques des nanoparticules				
	Type de cœur	Agent chélatant	Silicium par gadolinium	TPC par gadolinium	Type et taux peptide par nanoparticule
			théorique	théorique	théorique
1	GC	DTPA	1	0,1	L10
2	GC	DOTA	2	0,01	L10
3	PC	DTPA	4	0	L10
4	PC	DTPA	4	0,1	L5
5	PC	DOTA	2	0,1	L5
6	GC	DTPA	4	0,01	L5
7	PC	DOTA	1	0	L5
8	PC	DOTA	4	0,1	S5
9	GC	DOTA	1	0,01	S5
10	GC	DTPA	2	0	S5
11	GC	DOTA	4	0,1	0
12	PC	DTPA	2	0,01	0
13	PC	DOTA	4	0	0

Le plan d'expérience que j'ai réalisé est composé de 13 lots de nanoparticules dont les compositions varient en fonction de la taille du cœur (GC/PC), de l'agent chélatant (DTPA/DOTA), de l'épaisseur de la couche silice qui enrobe le cœur (1, 2, 4 Si qui correspondent respectivement à 1, 2, 4 moles de silice par mole de gadolinium), du taux théorique de TPC liée de façon covalente dans la couche de polysiloxane, de la nature (L pour ATWLPPR/peptide ligand et S pour LWRPTPA/peptide *scrambled*) et du taux théorique de peptides greffés (0, 5, 10) sur les nanoparticules.

Les nanoparticules fournies par le LCMPL de Lyon sont reçues sous forme lyophilisée dans des piluliers opaques fermés hermétiquement par un septum en caoutchouc scellé par une bague en aluminium. Les lots de nanoparticules sont conservés au réfrigérateur (T = 3 à 5°C) entre leur réception et leur utilisation.

#### • Greffage des peptides

Les nanoparticules sont dispersées dans de l'eau milliQ (18,6 mΩ) préalablement filtrée sur un filtre seringue de 0,20 μm pour éliminer les impuretés. L'eau est ajoutée à raison de 1 mL pour 100 μmol de Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Après 10 à 15 minutes, les contenus des différents piluliers (d'un même lot) sont réunis et chaque pilulier est rincé avec le même volume (100 μL) d'eau milliQ puis ces volumes sont ajoutés à la solution de nanoparticules. Pour obtenir une concentration finale de 0,091 M. La solution de nanoparticules est placée sous agitation dans un ballon entouré de papier aluminium. 200 μL d'une solution de NaOH (1M) sont ajoutés et la solution est laissée à agiter pendant 15 minutes.

Une solution mère de peptide protégé de concentration 1 mg.mL<sup>-1</sup> dans le DMSO, une autre solution de HOBt (1-hydroxybenzotriazole) dans le DMSO (1 mg.mL<sup>-1</sup>) et une solution d'EDC (hydrochlorure de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide) dans l'eau milliQ (1 mg.mL<sup>-1</sup>) sont placées 5 minutes dans

un bain à ultrasons. Les solutions d'activateurs EDC et HOBt sont ajoutées à la solution de nanoparticules, à raison de 1,2 équivalent de chacun d'eux par équivalent de peptides à ajouter aux nanoparticules, et ils sont laissés à réagir 15 minutes. Le peptide est ensuite ajouté à raison de 1,2 équivalent par rapport au nombre de peptides théorique souhaité par nanoparticule. Une fois les volumes nécessaires ajoutés, le mélange est laissé à réagir 8 heures sous agitation. Un large excès de TFA (500  $\mu$ L) est ajouté à la solution de nanoparticules et la solution est laissée à agiter pendant 2 heures afin de déprotéger les peptides présents dans la solution par élimination des protections latérales Pbf, Boc et tBu (Figure 151).

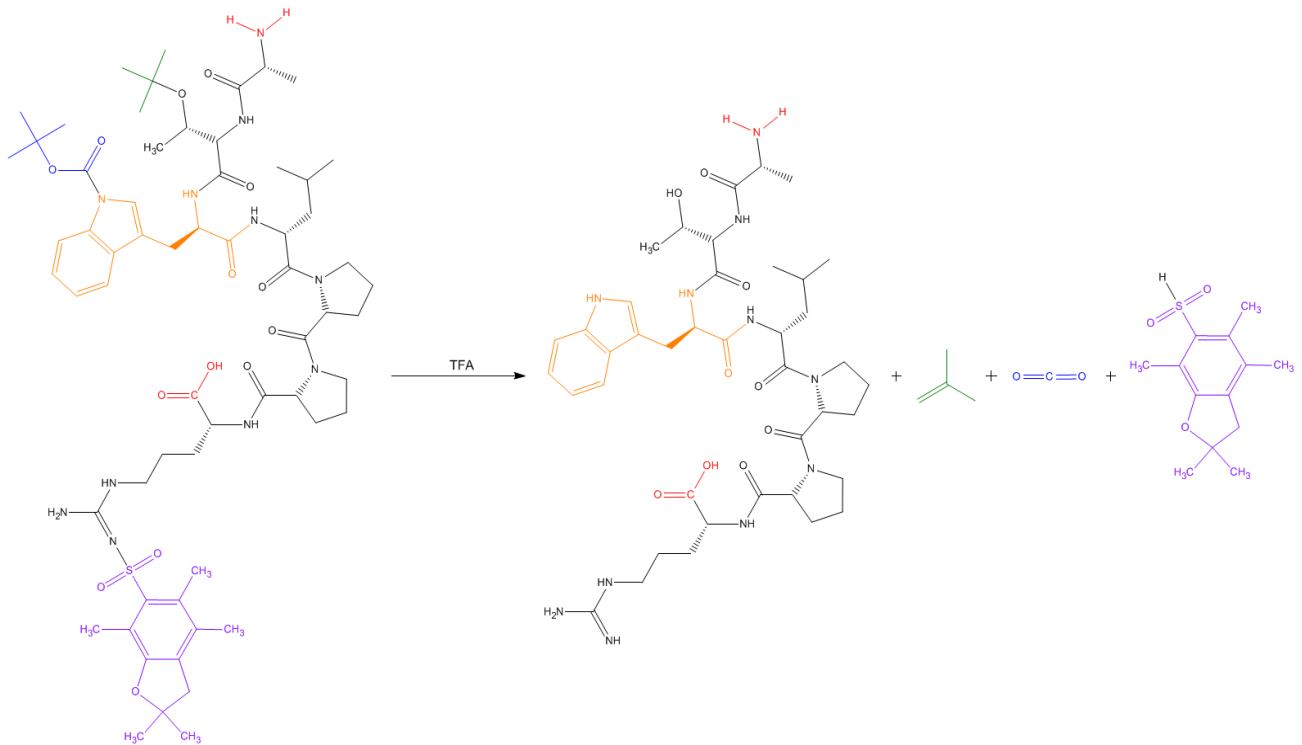


Figure 151 : Schéma de la déprotection du peptide ATWLPPR protégé par les fonctions Pbf (violet), Boc (bleu) et tBu (vert).

### • Purification des nanoparticules

Après que les protections aient été clivées, les nanoparticules doivent être purifiées. Pour cela, la purification est effectuée en deux étapes. La première consiste en une purification par dialyse. La solution de nanoparticules est placée dans un boudin de dialyse (cellulose régénérée) de type « *Spectra/Por® Dialysis Membrane* » avec un seuil de coupure de 1.000 kDa (kiloDalton). La purification est effectuée par un échange osmotique des impuretés contenues à l'intérieur du boudin vers l'eau faiblement concentrée à l'extérieur. Pour cela, les premières dialyses d'une durée de deux fois 1 h sont effectuées avec un bain constitué d'un mélange H<sub>2</sub>O/TFA (20/1 : v/v) ce qui favorise le passage des espèces les moins hydrophiles de l'intérieur du boudin de dialyse le bain. Le mélange des bains de dialyse est ensuite remplacé par de l'eau milliQ qui est changée toutes les 90 minutes jusqu'à ce que le pH de l'eau soit proche de la neutralité (le test est effectué avec un papier pH). La deuxième étape consiste à concentrer les nanoparticules par centrifugation à l'aide de tubes Vivaspin® possédant une membrane en polyéthersulfone avec un seuil de coupure de 3000 MWCO. La solution de nanoparticules est placée dans plusieurs tubes qui sont centrifugés plusieurs fois par sessions de 15 minutes avec une vitesse de rotation 3000 rpm (rotation par minute). Entre chaque centrifugation, les solutions de

nanoparticules sont agitées à l'aide d'un Vortex et le pH de la solution récupérée dans les culots des tubes est testé. Lorsque le volume de la solution n'est plus que d'environ 1 mL, la solution est concentrée à l'évaporateur rotatif ( $T_{\text{bain}} \leq 35^{\circ}\text{C}$ ) jusqu'à atteindre un volume proche de celui désiré pour les tests biologiques ultérieurs (quelques centaines de microlitres), ce qui correspond à une concentration en gadolinium de  $\approx 1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Le pH de la solution finale est mesuré au pH-mètre et celui-ci est ajusté, si nécessaire, à une valeur proche de celle du pH physiologique (7,4) par des ajouts d'une solution de NaOH 1M. La solution ainsi obtenue est ensuite diluée avec de la solution physiologique (solution de chlorure de sodium de concentration  $0,009 \text{ g.mL}^{-1}$  soit  $154 \text{ mmol.L}^{-1}$  en ions  $\text{Na}^+$ ) pour atteindre une concentration de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  puis elle est conditionnée dans des tubes Eppendorf et elle est stockée au réfrigérateur dans l'attente de son utilisation.

- **Mesures photophysiques**

Quelques dizaines de  $\mu\text{L}$  de solution de nanoparticules (avant et après le greffage peptidique) sont prélevés et additionnés d'EtOH absolu pour obtenir une solution, d'un volume de 3 mL, dont la valeur de l'absorption à 414 nm ( $\text{Do}_{414 \text{ nm}}$ ) est proche de 0,2. Les mesures de fluorescence (600 nm à 800 nm) du PS excité à 414 nm et de luminescence de  $^1\text{O}_2$  formé (de 1200 nm à 1350 nm) après l'excitation du PS à 414 nm sont effectuées pour évaluer les rendements quantiques de fluorescence et de formation de  $^1\text{O}_2$  (de chaque lot de nanoparticules) par comparaison avec deux références (la TPP dans le toluène pour la fluorescence ( $\phi_{\text{f (TPP)}} = 0,11$ ) et le rose de bengal dans l'EtOH ( $\phi_{\Delta (\text{rose de bengale})} = 0,69$ , tous les deux avec une  $\text{Do}_{414 \text{ nm}} \approx 0,2$ ).

## **II. 3. Résultats du plan d'expériences**

### **II. 3. a. Propriétés photophysiques des nanoparticules**

Nous allons présenter les spectres d'absorption, les spectres de fluorescence, les spectres de luminescence de  $^1\text{O}_2$  et les spectres de fluorescence du peptide greffé pour les différents lots du plan d'expérience ainsi qu'un tableau récapitulatif des rendements quantiques de fluorescence ( $\phi_{\text{f}}$ ) et de formation de  $^1\text{O}_2$  ( $\phi_{\Delta}$ ) obtenus dans l'éthanol.

Les courbes bleues représentent les nanoparticules avant le greffage des peptides, les courbes rouges sont les nanoparticules après greffage des peptides.

### Lot 1 (GC DTPA 1Si TPC 0,1 L10)

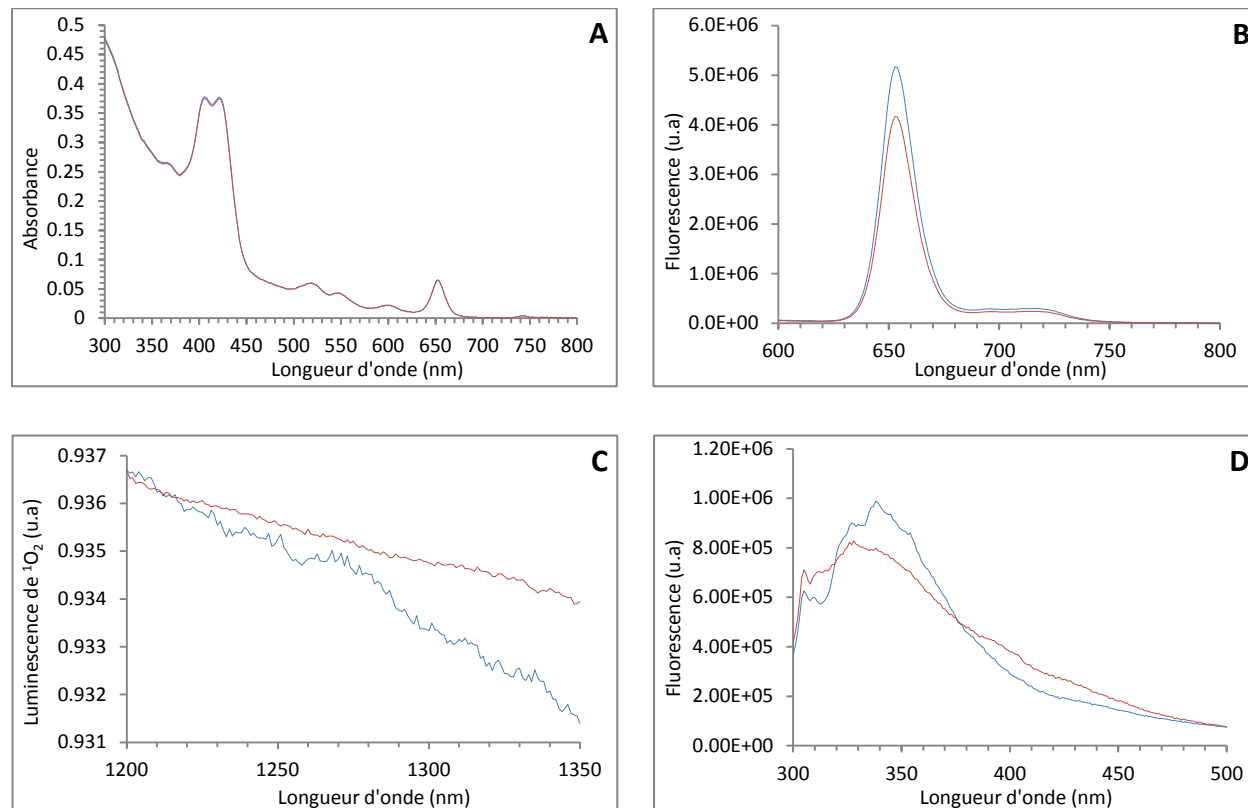


Figure 152 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence,  $\lambda_{\text{exc}} = 414 \text{ nm}$  ; C) Spectres de luminescence de  $^1\text{O}_2$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 414 \text{ nm}$  ; D) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ .

Les spectres d'absorption UV-visible du lot 1 (Figure 152 A) présentent une même allure et montrent la présence de chlorure avant et après greffage des peptides. Cependant, on peut voir que la ligne de base n'est pas horizontale ce qui pourrait s'expliquer par une certaine agrégation de ces nanoparticules.

Les spectres de fluorescence ont des allures similaires (Figure 152 B) et des intensités équivalentes.

De façon surprenante et non expliquée, les spectres de la luminescence de  $^1\text{O}_2$  montrent qu'il n'y a pas de formation de  $^1\text{O}_2$  (Figure 152 C). Cette absence de formation de  $^1\text{O}_2$  pourrait être due soit à une faible diffusion de l'oxygène dans la nanoparticule, soit à l'eau ajoutée lors de la préparation des échantillons dans l'EtOH (ou les deux à la fois).

Les spectres de fluorescence du peptide avant et après greffage révèlent une large bande centrée vers 350 nm (Figure 152 D). La fluorescence parasite avant greffage est certainement due à des résidus fluorescents de synthèse.



### Lot 2 (GC DOTA 2Si TPC 0,01 L10)

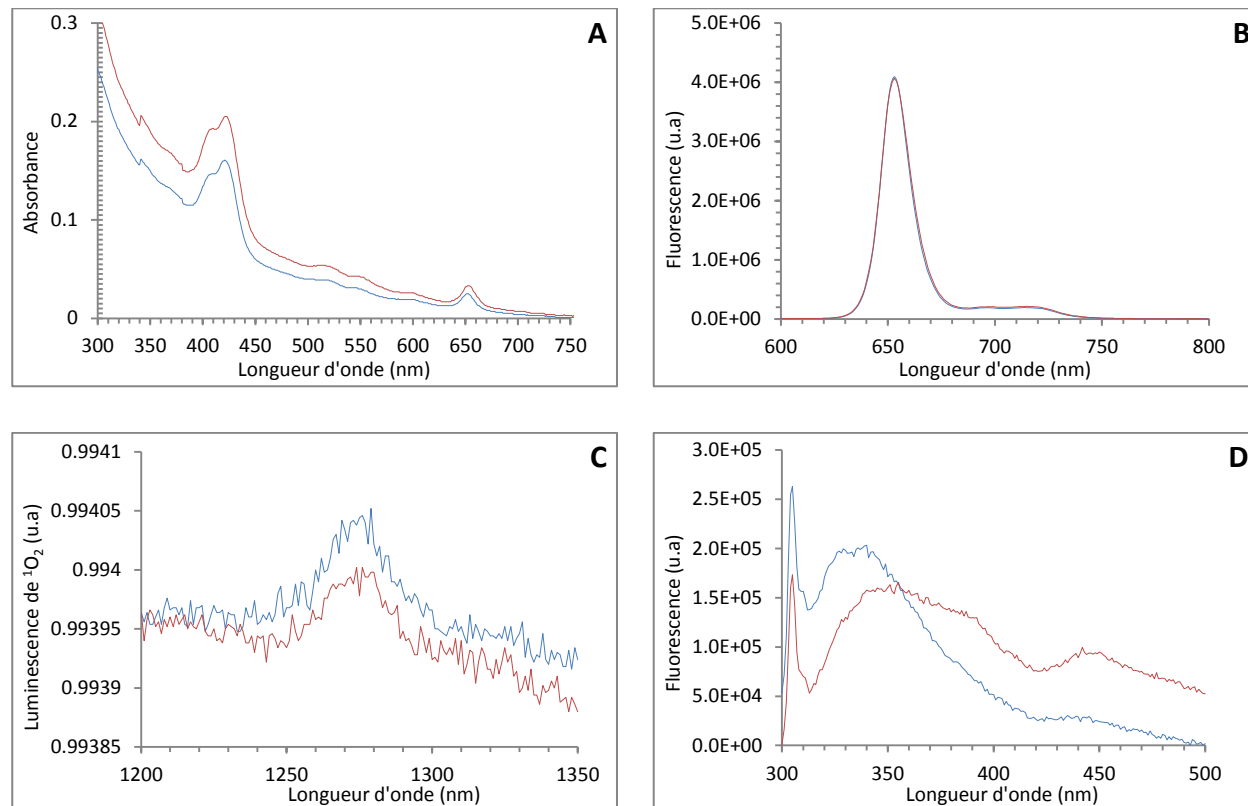


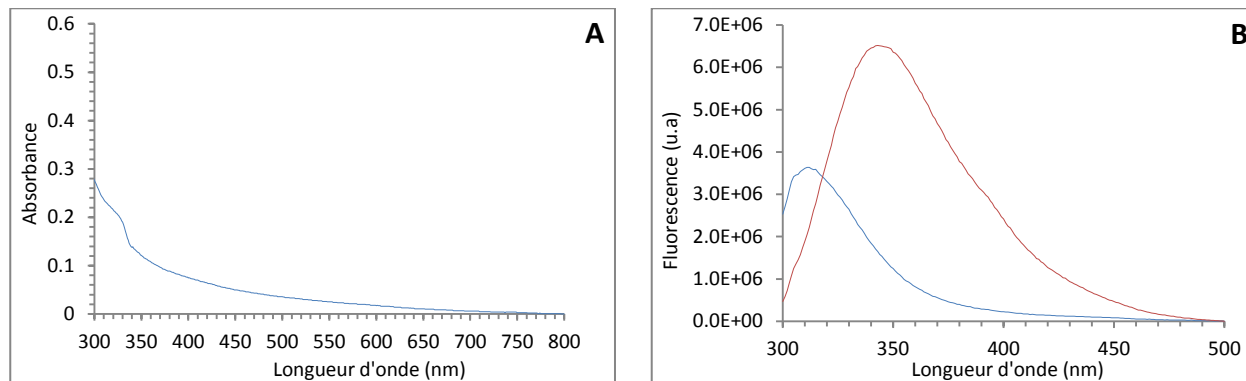
Figure 153 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; C) Spectres de luminescence de  $^1O_2$ ,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{exc} = 280$  nm.

Les spectres d'absorption UV-visible (Figure 153 A) révèlent la présence de la TPC et peuvent laisser à supposer qu'une faible agrégation des nanoparticules dans l'EtOH est possible. Les spectres de fluorescence sont identiques (Figure 153 B), l'intensité de fluorescence n'a pas changé après le greffage du peptide.

Les spectres luminescence de  $^1O_2$  montrent une conservation de la formation d' $^1O_2$  avant et après greffage des peptides (Figure 153 C).

Les spectres de fluorescence du lot 2 excité à 280 nm (Figure 153 D) montrent une fluorescence présente avant le greffage des peptides due à des impuretés fluorescentes de synthèse résiduelles, comme nous l'avons déjà suggéré.

### Lot 3 (PC DTPA 4Si TPC 0 L10)



Le spectre d'absorption UV-visible du lot 3 ne montre aucune absorption (Figure 154 A), en adéquation avec le fait qu'il n'y a pas de chlore greffé dans ce lot.

Le spectre de fluorescence de ce lot, excité à 280 nm (Figure 154 B) montre, avant le greffage des peptides, une fluorescence parasite dont le maximum se situe à environ 310 nm. Le greffage du peptide, quant-à-lui, induit une émission de fluorescence typique du tryptophane à 350 nm.

#### Lot 4 (PC DTPA 4Si TPC 0,1 L5)

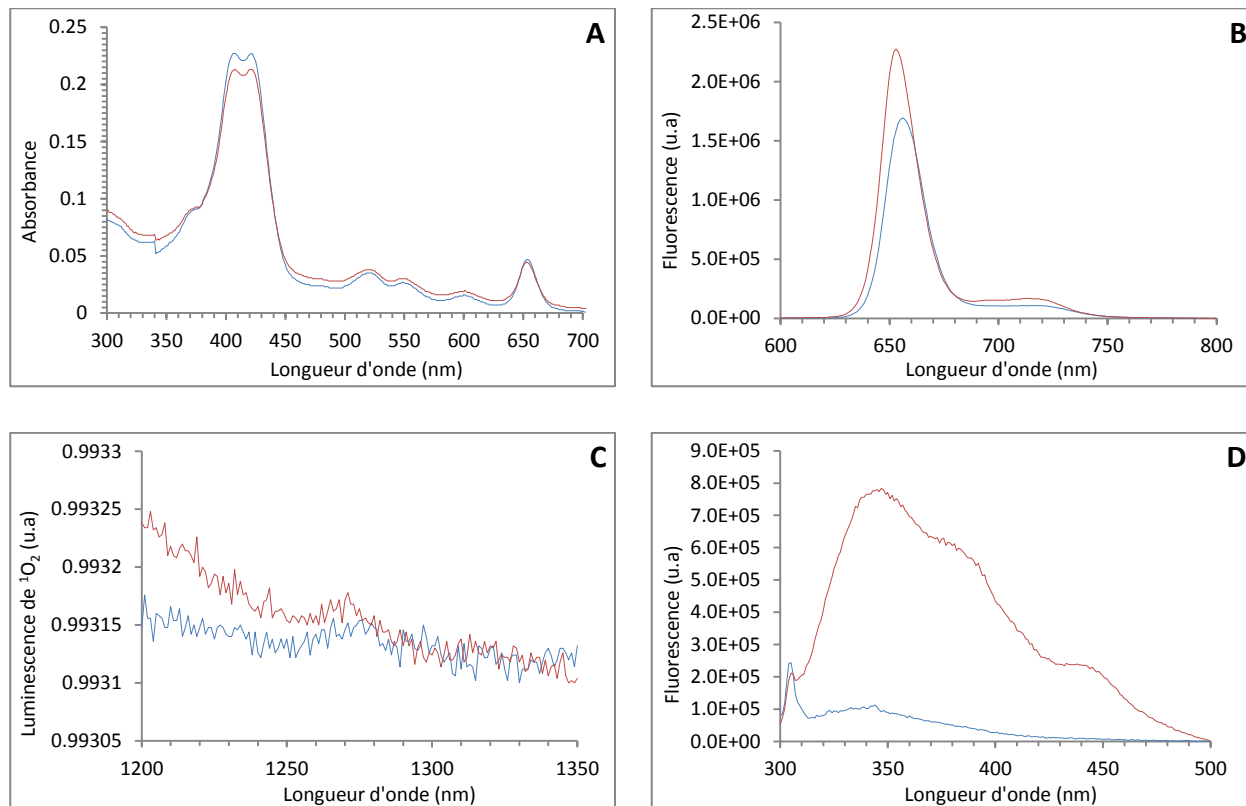


Figure 155 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence,  $\lambda_{\text{exc}} = 414 \text{ nm}$  ; C) Spectres de luminescence de  $^1\text{O}_2$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 414 \text{ nm}$  ; D) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ .

Les spectres d'absorption UV-visible du lot 4 sont typiques de la TPC (Figure 155 A).

Les spectres de fluorescence montrent que le photosensibilisateur émet toujours après le greffage du peptide et l'excitation à 414 nm (Figure 155 B) avec une intensité légèrement supérieure à celle avant greffage du peptide inexplicée.

Les spectres de luminescence de  $^1\text{O}_2$  des nanoparticules avant et après greffage du peptide montrent un très faible rendement quantique de formation de  $^1\text{O}_2$  (Figure 155 C). Cette absence de formation de  $^1\text{O}_2$  pourrait être due soit à une faible diffusion de l'oxygène dans la nanoparticule, soit à l'eau ajoutée lors de la préparation des échantillons dans l'EtOH (ou les deux à la fois).

Les spectres de fluorescence du peptide (Figure 155 D) montrent la présence de peptides greffés en surface des nanoparticules. Cependant, nous pouvons remarquer qu'il y a deux épaulements avec des maximums de fluorescence situés à 350 nm, environ 380 nm et 440 nm. Ceci pourrait indiquer une dégradation du peptide lors de l'étape de centrifugation.

### Lot 5 (PC DOTA 2 Si TPC 0,1 L5)

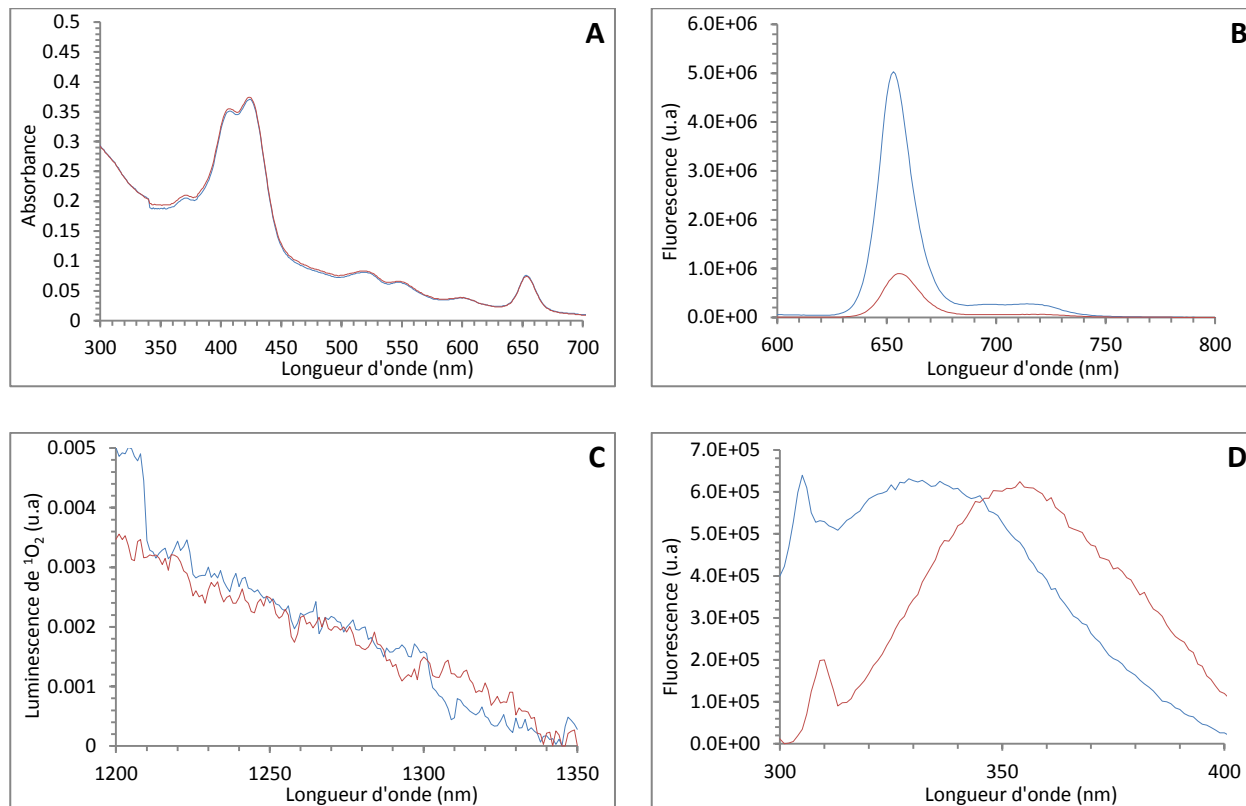


Figure 156 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence,  $\lambda_{exc} = 414 \text{ nm}$  ; C) Spectres de luminescence de  $^1\text{O}_2$ ,  $\lambda_{exc} = 414 \text{ nm}$  ; D) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ .

Les spectres d'absorption UV-visible du lot 5 montrent la présence de chlorure dans les nanoparticules (Figure 156 A) avec une possible agrégation de ces nanoparticules dans l'EtOH.

L'analyse des spectres de fluorescence de la TPC (Figure 156 B) montre une diminution de la fluorescence après le greffage du peptide.

Les spectres de luminescence de  $^1\text{O}_2$  des nanoparticules avant et après greffage du peptide n'indiquent aucune formation de  $^1\text{O}_2$  (Figure 156 C). Cette absence de détection de  $^1\text{O}_2$  peut être due soit à une faible diffusion de l'oxygène dans la nanoparticule, soit à l'eau ajoutée lors de la préparation des échantillons dans l'EtOH (ou les deux à la fois), comme nous l'avons déjà suggéré.

Le spectre de fluorescence du lot 5 avant greffage, après excitation à 280 nm, montre une émission de fluorescence dont le maximum est situé à environ 330 nm ainsi qu'une bande d'émission de fluorescence vers 450 nm (Figure 156 D). Suivant l'hypothèse énoncée plus haut, nous avons considéré que cette émission de fluorescence provient d'impuretés qui sont éliminées lors des étapes de purification. D'après le spectre de fluorescence après greffage des peptides, nous pouvons remarquer la présence d'une émission de fluorescence avec un maximum à 360 nm qui correspond à celle du peptide.

### Lot 6 (GC DTPA 4 Si TPC 0,01 L5)

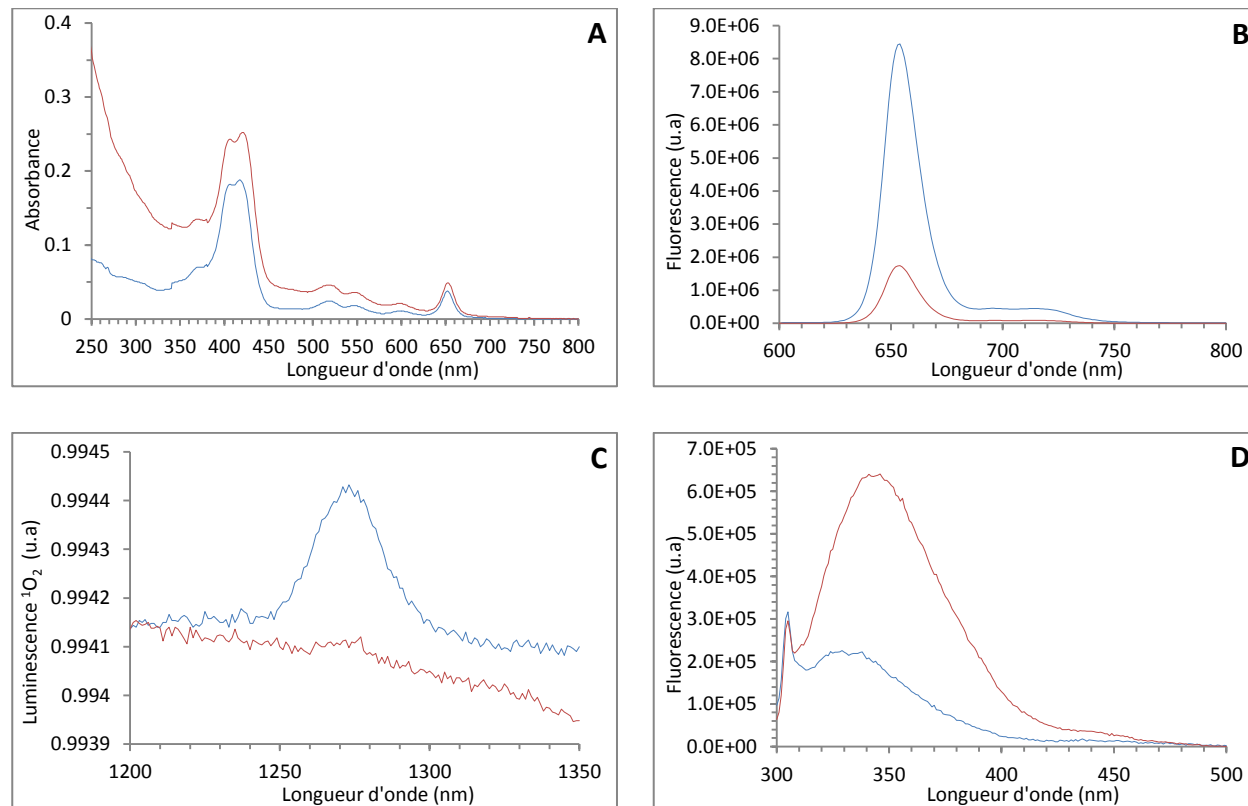


Figure 157 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence,  $\lambda_{\text{exc}} = 414 \text{ nm}$  ; C) Spectres de luminescence de  $^1\text{O}_2$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 414 \text{ nm}$  ; D) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ .

Les spectres d'absorption UV-visible du lot 6 (Figure 157 A) montre la présence de TPC-COOH dans les nanoparticules. Il semble qu'une agrégation ait lieu après le greffage du peptide.

Les spectres de fluorescence de la TPC avant et après le greffage des peptides montre une forte diminution de la fluorescence après le greffage peptidique (Figure 157 B), corrélée par l'observation faite en UV-visible.

Les spectres de luminescence de  $^1\text{O}_2$  montrent une absence de formation de l'oxygène singulet après le greffage des peptides (Figure 157 C).

Le spectre de fluorescence avant greffage du peptide montre une fluorescence parasite sans doute due à des impuretés de synthèse (Figure 157 D). La fluorescence observée après greffage peptidique révèle la présence de peptide greffé.

### Lot 7 (PC DOTA 1 Si TPC 0 L5)

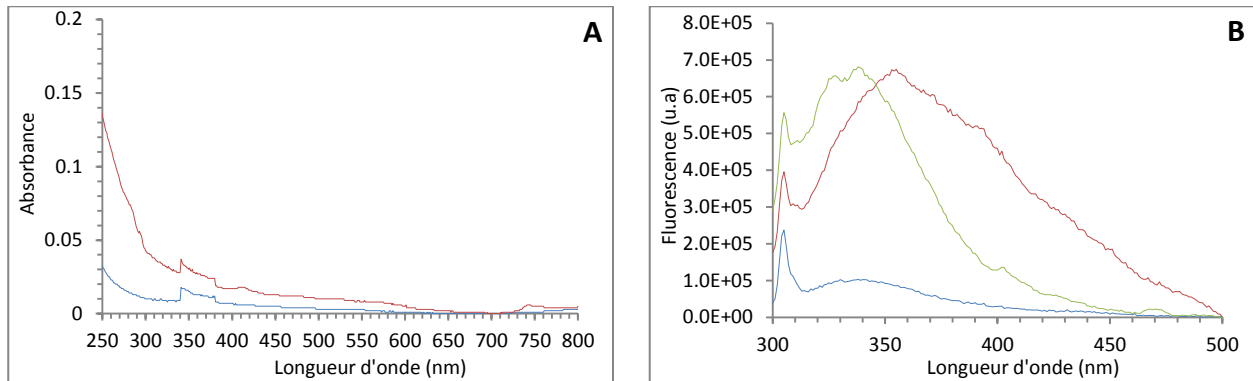


Figure 158 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{exc} = 280$  nm.

Les spectres d'absorption UV-visible du lot 7 avant et après le greffage des peptides (Figure 158 A) montrent qu'il n'y a pas d'absorption, ce qui est en accord avec les caractéristiques de ce lot.

Les spectres d'émission de fluorescence du lot 7 avant le greffage des peptides (Figure 158 B) montrent la présence d'une émission de fluorescence après excitation à 280 nm (courbe verte). Cette fluorescence due à une impureté a été éliminée par le lavage des nanoparticules (courbe bleue). Le spectre de fluorescence après le greffage du peptide sur les nanoparticules montre, quant à lui, la présence de peptide, grâce à la fluorescence caractéristique du tryptophane à 350 nm.

Ce lot ne comportant pas de TPC, les spectres de fluorescence de la TPC et de luminescence de l' $^1O_2$  n'ont pas été effectués.

### Lot 8 (PC DOTA 4 Si TPC 0,1 S5)

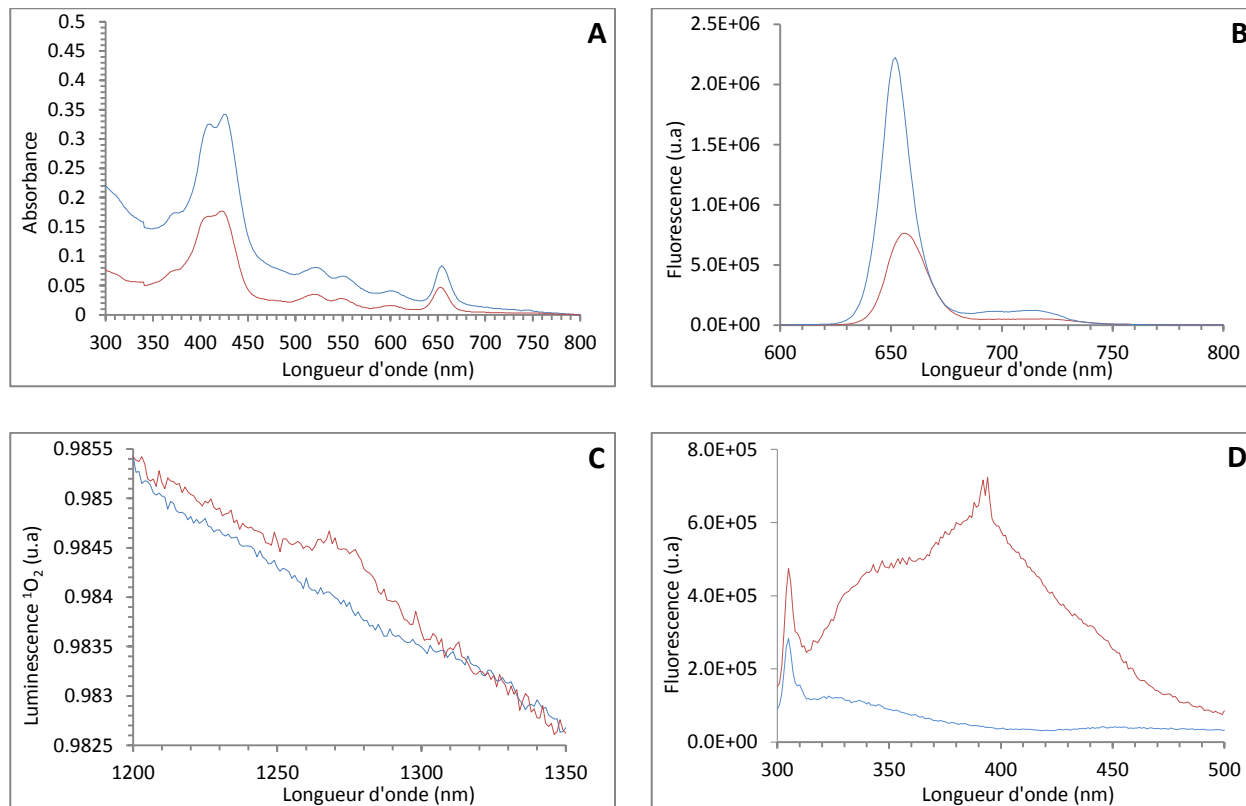


Figure 159 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; C) Spectres de luminescence de  $^1O_2$ ,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{exc} = 280$  nm.

Les spectres d'absorption UV-visible du lot 8 montrent la présence de chlorure greffé aux nanoparticules (Figure 159 A). Une possible agrégation avant greffage est envisagée.

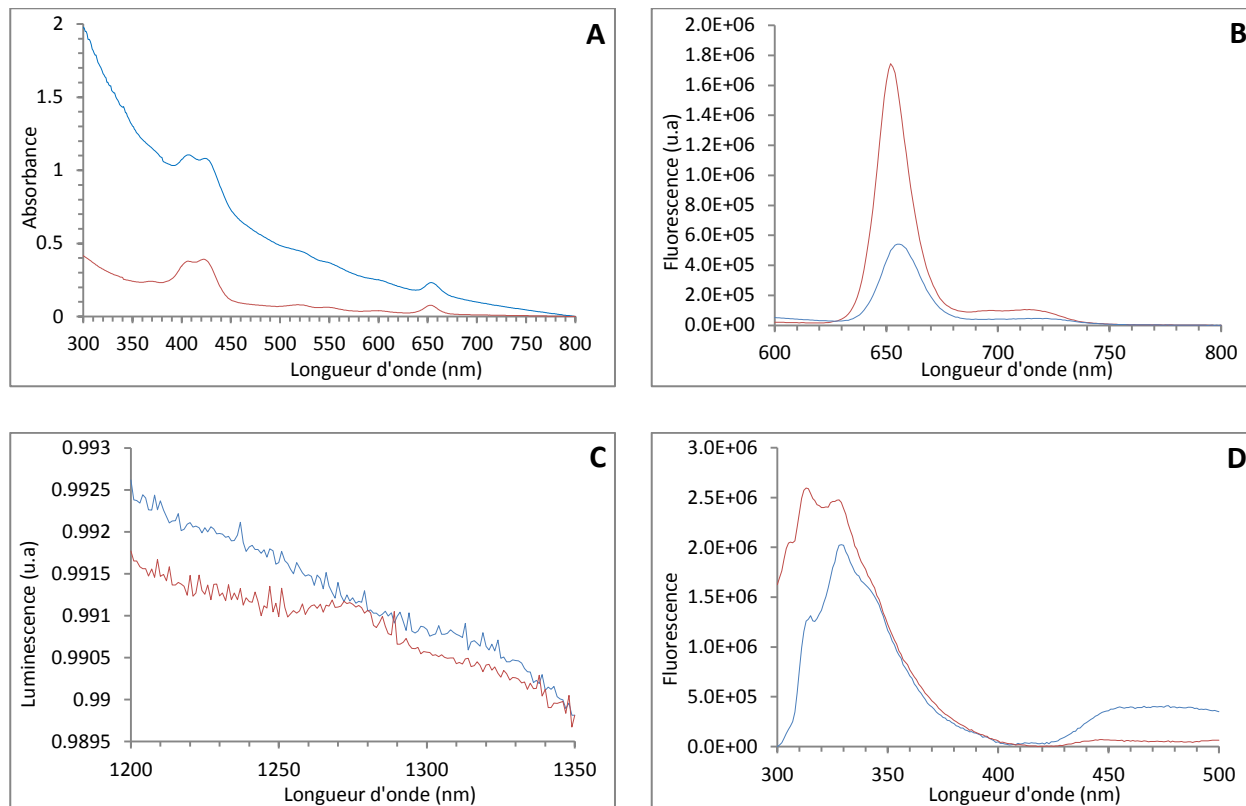
Le spectre de fluorescence de la TPC après le greffage du peptide indique une augmentation d'un facteur 3 de l'intensité de fluorescence par rapport à celle de l'échantillon avant le greffage des peptides (Figure 159 B), en accord avec les spectres d'absorption obtenus.

Les spectres de luminescence de  $^1O_2$  avant et après le greffage peptidique indiquent aucune formation de  $^1O_2$  avant et une très faible formation de  $^1O_2$  après, toujours en accord avec une possible agrégation (Figure 159 C).

Le spectre de fluorescence du lot 8 après le greffage du peptide montre, comme attendu, une bande à 350 nm mais également un pic inconnu, non identifié, à 390 nm.



### **Lot 9 (GC DOTA 1 Si TPC 0,01 S5)**



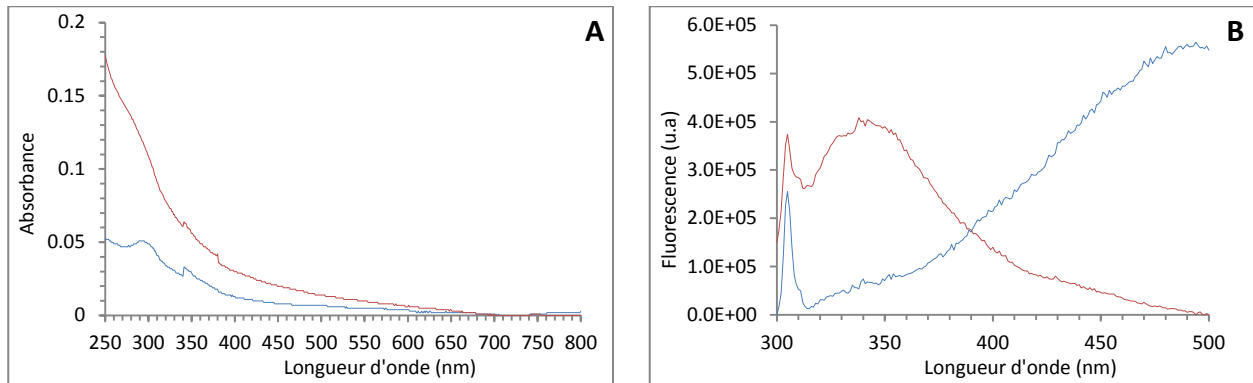
**Figure 160 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; C) Spectres de luminescence de  $^1O_2$ ,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{exc} = 280$  nm.**

Les spectres d'absorption UV-visible des nanoparticules montrent une forte agrégation des nanoparticules après greffage (Figure 160 A). La diminution de l'intensité de fluorescence (Figure 160 B) d'un facteur 3 est en accord avec cette constatation, tout comme l'absence de formation d' $^1O_2$  (Figure 160 C).

Les spectres de fluorescence après excitation à 280 nm montrent une émission de fluorescence inconnue provenant sans doute d'une impureté de synthèse qui n'a pas pu être éliminée par les étapes de lavage. Aucune détection typique de la fluorescence du tryptophane n'a été enregistrée.

Le greffage du peptide a été effectué trois fois, sur différents lots de nanoparticules, sans succès (Figure 160 D). Pour ce lot, nous n'avons jamais réussi à greffer du peptide.

### **Lot 10 (GC DTPA 2 Si TPC 0 S5)**



**Figure 161 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; C) Spectres de luminescence de l' $^1O_2$ ,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{exc} = 280$  nm.**

Le spectre d'absorption UV-visible du lot 10 avant le greffage des peptides montre une absorption à environ 280 nm qui pourrait expliquer le spectre de fluorescence obtenu avant greffage (Figure 161 A).

Le spectre de fluorescence du lot 10 excité à 280 nm avant le greffage des peptides montre une fluorescence parasite avec un maximum à environ 480 nm. Cette fluorescence est certainement due à une impureté puisqu'elle disparaît, après le greffage des peptides, pour laisser place au spectre typique de fluorescence du tryptophane avec un maximum à environ 350 nm (Figure 161 B).

### Lot 11 (GC DOTA 4 Si TPC 0,1)

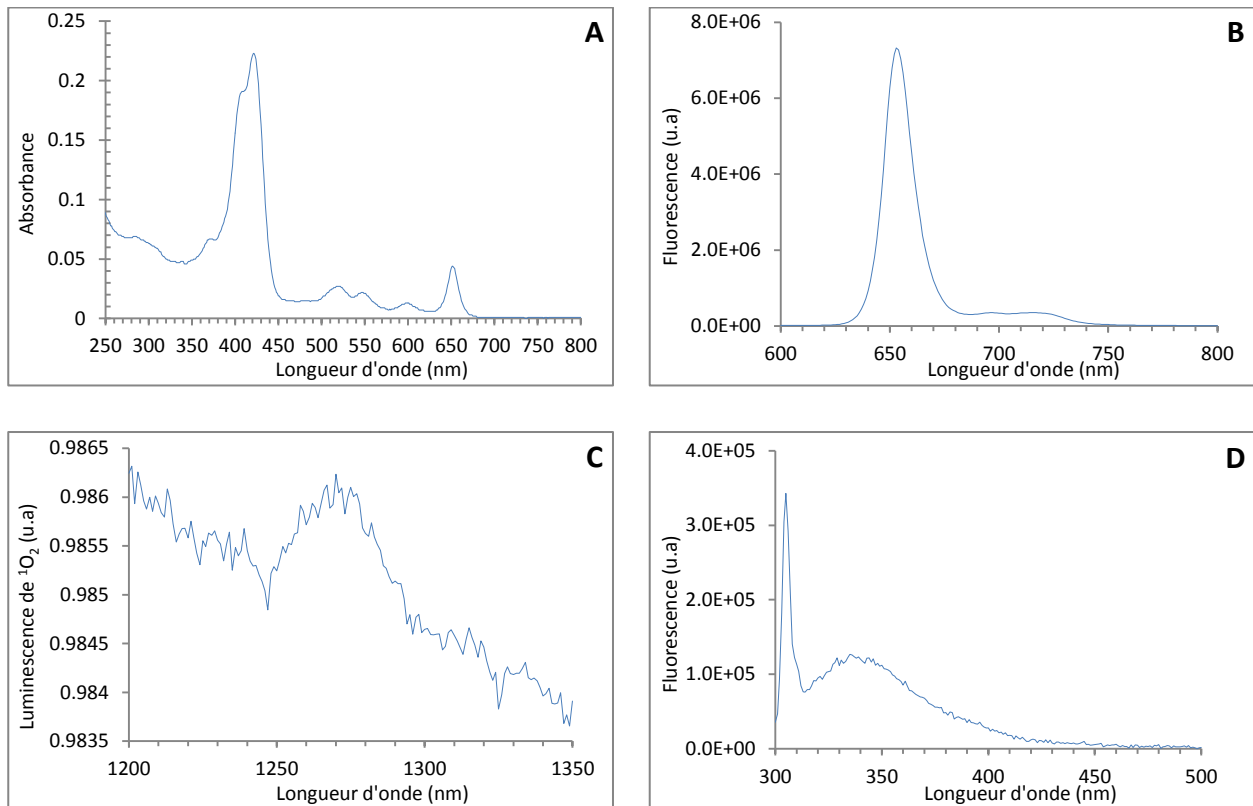


Figure 162 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; C) Spectres de luminescence de  $^1O_2$ ,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{exc} = 280$  nm.

Le spectre d'absorption UV-visible du lot 11 montre la présence de la TPC (Figure 162 A), corroboré par la fluorescence détectée après excitation à 414 nm (Figure 162 B). Une faible production d'oxygène singulet en comparaison la référence (TPC-COOH) (Figure 162 C) est détectée.

Le spectre de fluorescence du lot 11 excité à 280 nm montre une émission de fluorescence avec un maximum à 340 nm (Figure 162 D) sans doute due à une impureté résiduelle.

### Lot 12 (PC DTPA 2 Si TPC 0,01)

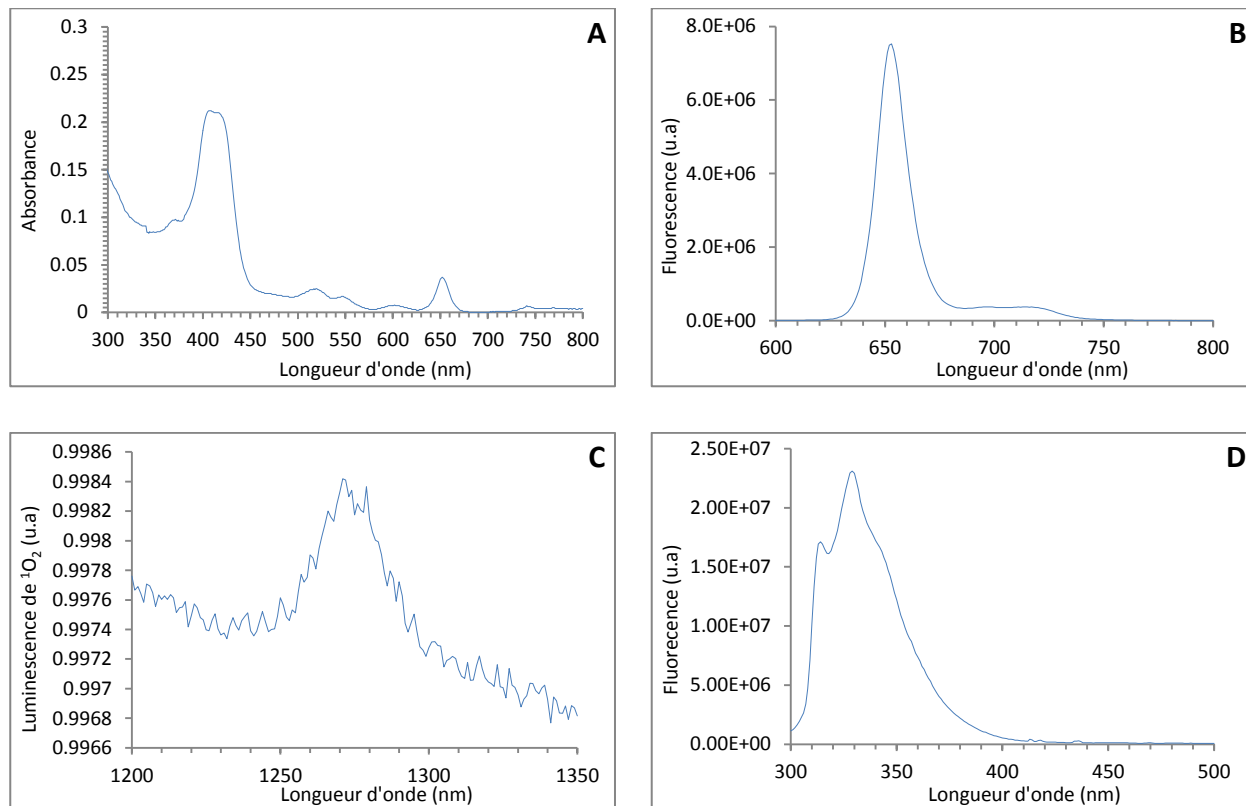


Figure 163 A, B, C, D : A) Spectres d'absorption UV-visible ; B) Spectres de fluorescence,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; C) Spectres de luminescence de  $^1O_2$ ,  $\lambda_{exc} = 414$  nm ; D) Spectres de fluorescence du peptide,  $\lambda_{exc} = 280$  nm.

Le spectre d'absorption UV-visible du lot 12 est typique de la TPC (Figure 163 A), tout comme le spectre de fluorescence excité à 414 nm (Figure 163 B).

Le spectre de luminescence de  $^1O_2$  montre la formation d'oxygène singulet (Figure 163 C).

Le spectre de fluorescence du lot 12 excité à 280 nm montre la présence d'une fluorescence parasite centrée à 330 nm (Figure 163 D), déjà observé pour le lot 9.

### Lot 13 (PC DOTA 4 Si TPC 0)

Ce lot ne contenant pas de TPC et ne nécessitant pas de greffage de peptide, le spectre d'absorption UV-visible, celui de fluorescence du PS et le spectre de luminescence de  $^1O_2$  formé n'ont pas été effectués.

## II. 3. a. i. Analyse des résultats

### • Données photophysiques

Les données photophysiques ainsi que les rendements de couplage du peptide sont répertoriés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Rendements de fluorescence de la TPC et de luminescence de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> formé par les lots de nanoparticules, λ<sub>exc.</sub> = 414 nm.

Lot	Caractéristiques des nanoparticules					Nombre de TPC/Gd couplés estimés (par UV-vis à 650 nm)	Φ <sub>f</sub> avant greffage du peptide	Φ <sub>f</sub> après greffage du peptide	Φ <sub>102</sub> avant greffage du peptide	Φ <sub>102</sub> après greffage	Nb peptides couplés (fluo λ <sub>exc.</sub> =280 nm / λ <sub>ém.</sub> =350 nm)
	Type de cœur	Surfactant	Si/Gd	TPC /Gd	Type et taux de peptide / nanoparticule						
TPC				théo			0,21		0,65		
1	GC	DTPA	1	0,1	L10	0,010	0,08	0,06	0	0	6*
2	GC	DOTA	2	0,01	L10	0,004	0,17	0,15	0,50	0,44	6
3	PC	DTPA	4	0	L10	-	-	-	-	-	14*
4	PC	DTPA	4	0,1	L5	0,013	0,19	0,18	0,69	0,66	4
5	PC	DOTA	2	0,1	L5	0,017	0,07	0,02	0	0	3
6	GC	DTPA	4	0,01	L5	0,017	0,17	0,04	0,53	0,03	4*
7	PC	DOTA	1	0	L5	-	-	-	-	-	4*
8	PC	DOTA	4	0,1	S5	0,017	0,03	0,02	0,05	0	3*
9	GC	DOTA	1	0,01	S5	0,328	0,04	0,02	0	0,05	0 (pas de greffage après 3 essais)*
10	GC	DTPA	2	0	S5	-	-	-	-	-	3*
11	GC	DOTA	4	0,1	0	0,040	0,11	-	0,18	-	Pas de peptide*
12	PC	DTPA	2	0,01	0	0,040	0,14	-	0,23	-	Pas de peptide
13	PC	DOTA	4	0	0	-	-	-	-	-	-

« \* » Fluorescence présente avant greffage du peptide (λ<sub>exc.</sub> = 280 nm ; λ<sub>fluo.</sub> = 340 nm).

La majeure partie des lots présente des rendements quantiques de fluorescence et de luminescence de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> très inférieurs à ceux obtenus avec la référence (TPC-COOH) en solution, voire nuls. Pour expliquer cela, plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

- La première explication pourrait être celle de l'agrégation des nanoparticules dans l'EtOH engendrant ainsi un quenching de fluorescence et de luminescence de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

- La deuxième explication pourrait être celle de la perte de photosensibilisateur suite à la destruction de la coquille de silice qui enrobe le cœur des nanoparticules. En effet, il a été montré par Mignot et al. (2013) <sup>[351]</sup> et dans la thèse de Jessica Morlieras (2013) que le cœur des nanoparticules se dissout et que l'enveloppe de silice se désintègre sous forme de SRP (*Small Rigid Platform*). Il est donc probable que certaines SRP soient de taille suffisamment faible pour être éliminées dans le sous-nageant durant la

phase de centrifugation, étant donné l'importante force centrifuge qui leur est appliquée et la taille des pores de la membrane (3000 kDa) qui est supérieure à ceux du boudin de dialyse (1000 kDa).

- Une troisième explication pourrait être celle de l'ajout d'eau lors de la préparation des échantillons utilisés pour l'étude des propriétés photophysiques des nanoparticules. En effet, la durée de vie de l' $^1\text{O}_2$  est beaucoup plus faible dans l'eau ( $2 \mu\text{s}$  <sup>[352]</sup>) que dans l'EtOH ( $12 \mu\text{s}$  <sup>[352]</sup>), ce qui pourrait expliquer la diminution du rendement quantique de luminescence de l' $^1\text{O}_2$  et la diminution du rendement quantique de fluorescence du photosensibilisateur <sup>[32]</sup>. Afin de vérifier ces hypothèses, il pourrait être intéressant d'effectuer une ATG (analyse thermogravimétrique) sur les nanoparticules lyophilisées avant le greffage du peptide et après.

- Une autre explication serait l'absence de diffusion de l' $\text{O}_2$  à travers la couche de silice depuis l'extérieure de la nanoparticule vers le PS, ce qui ne permettrait pas de former de l' $^1\text{O}_2$ .

En comparant les données photophysiques obtenues pour chacun des lots du plan d'expérience, et en ne se focalisant que sur un paramètre à la fois, il semblerait que les rendements quantiques de fluorescence et de formation de  $^1\text{O}_2$  ne soient corrélés qu'avec la quantité de silice utilisée pour l'enrobage et/ou la taille du cœur de la nanoparticule (la taille du cœur étant elle-même reliée à la quantité de silice puisque la quantité de précurseurs ajoutés pour former l'enveloppe est calculée à partir du nombre de moles de gadolinium dans le  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ ).

Il est à noter qu'il a été montré ultérieurement au début du plan d'expérience que dans ces petites nanoparticules, le cœur se dissout et que la structure de la silice s'effondre sur elle-même puis se fragmente en SRP <sup>[339, 351, 353]</sup>. Cette destruction de la structure de l'enveloppe de silice pourrait expliquer la perte de fluorescence des nanoparticules, par la perte du PS, après l'étape de greffage des peptides. De plus, l'effondrement de la coquille de silice sur elle-même pourrait expliquer certains rendements quantiques de luminescence de l' $^1\text{O}_2$  quasi nuls par un emprisonnement du PS dans la silice qui réduirait la diffusion de l'oxygène vers le PS puis celle de l' $^1\text{O}_2$  vers l'extérieure. Une autre hypothèse que nous avons formulée pour expliquer les faibles rendements est la présence d'eau. Il pourrait donc être intéressant de faire de l'ATG sur les nanoparticules lyophilisées avant le greffage du peptide et après (cela risque d'être plus compliqué puisque les nanoparticules greffées avec les peptides et lyophilisées ne se redispersent pas).

Ces résultats seront inclus dans une publication en cours d'écriture et incluse ci-dessous. Ils serviront à une analyse plus fine des résultats biologiques obtenus.

### • Greffage du peptide et des PS

Les rendements de couplage obtenus avec les différents lots de nanoparticules sont résumés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Rendements de greffage de la chlorine et des peptides sur les nanoparticules du plan d'expérience.

Lot	Caractéristiques des nanoparticules					Rendement de greffage de la TPC-COOH	Rendement de greffage des peptides
	Cœur de Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		Agent chélatant	Silice	TPC-COOH		
	Type de cœur	μmol	μmol	μmol	μmol		
1	GC	45	112,5	45	0,45	10	60
2	GC	45	90	90	0,18	40	60
3	PC	45	112,5	180	-	-	100
4	PC	45	112,5	180	0,59	13	80
5	PC	45	90	90	0,77	17	60
6	GC	45	112,5	180	0,77	100	80
7	PC	45	90	45	-	-	80
8	PC	45	90	180	0,77	17	60
9	GC	45	90	45	1,49	100	0
10	GC	45	112,5	90	-	-	60
11	GC	45	90	180	1,80	40	-
12	PC	45	112,5	90	1,80	100	-
13	PC	45	90	180	-	-	-

« - » : Les nanoparticules ne contiennent pas la molécule considérée.

- **Rendements de greffage peptidique**

Tableau 17 : Rendements de greffage peptidique.

Lot	Caractéristiques des nanoparticules					Φ <sub>f</sub> avant greffage du peptide	Φ <sub>f</sub> après greffage du peptide	Nb peptides couplés (fluo: λ <sub>exc.</sub> =280 nm/ λ <sub>émi.</sub> =350 nm)	Rendement de greffage des peptides
	Type de cœur	Agent chélatant	Si/Gd	TPC/Gd	Type et taux peptide/nanoparticule				
TPC				théo		0,21			
1	GC	DTPA	1	0,1	L10	0,08	0,06	6*	60
2	GC	DOTA	2	0,01	L10	0,17	0,15	6	60
3	PC	DTPA	4	0	L10	-	-	14*	100
4	PC	DTPA	4	0,1	L5	0,19	0,18	4	80
5	PC	DOTA	2	0,1	L5	0,07	0,02	3	60
6	GC	DTPA	4	0,01	L5	0,17	0,04	4*	80
7	PC	DOTA	1	0	L5	-	-	4*	80
8	PC	DOTA	4	0,1	S5	0,03	0,02	3*	60
9	GC	DOTA	1	0,01	S5	0,04	0,02	0 (pas de greffage après 3 essais)*	0
10	GC	DTPA	2	0	S5	-	-	3*	60

« \* » : Présence d'une fluorescence à 340 nm avant le couplage du peptide



Dix lots de nanoparticules du plan d'expérience ont nécessité un greffage peptidique (Tableau 17).

Les rendements de greffage obtenus sont de l'ordre de 60 à 100% ce qui prouve que le protocole mis en place est efficace. Cependant, un lot de nanoparticules (**lot 9**) fait exception à cette règle et n'a pas pu être fonctionnalisé avec le scrambled malgré trois tentatives infructueuses (deux tentatives de greffage sur le même lot de nanoparticules et la synthèse d'un nouveau lot 9 pour lequel le greffage du peptide LWRPTPA n'a pas non plus été effectif), même si la composition du lot 9 proche de celles des lots 1 et 2 (lot 1 : GC DTPA 1 Si TPC 0,1 L10 ; lot 2 : GC DOTA 2 Si TPC 0,01 L10). Cet échec n'a pas été expliqué à ce jour.

Une fluorescence parasite à 340 nm de certains lots de nanoparticules, avant le greffage peptidique, a été observée. Celle-ci peut être attribuée à la présence d'impuretés résiduelles de la synthèse des nanoparticules dont l'élimination a été mise en évidence lors de l'étape de purification après greffage.

- **Rendements de greffage de photosensibilisateur**

Sur les 13 lots qui constituent le plan d'expérience, seulement 9 ont été greffés avec du PS.

Tableau 18 : Rendements de greffage du photosensibilisateur.

Lot	Caractéristiques des nanoparticules					Rendement de greffage du PS après greffage du peptide par rapport au taux théorique
	Type de cœur	Agent chélatant	Si/Gd	TPC/Gd	Type et taux peptide/nanoparticule	
TPC				théo		
1	GC	DTPA	1	0,1	L10	10
2	GC	DOTA	2	0,01	L10	40
4	PC	DTPA	4	0,1	L5	13
5	PC	DOTA	2	0,1	L5	17
6	GC	DTPA	4	0,01	L5	100
8	PC	DOTA	4	0,1	S5	17
9	GC	DOTA	1	0,01	S5	100
11	GC	DOTA	4	0,1	0	40
12	PC	DTPA	2	0,01	0	100

Les rendements de greffage en TPC obtenus varient énormément d'un lot de nanoparticules à l'autre (de 10 à 100%) avec une moyenne d'environ 50% sur la totalité des lots contenant du PS et ils peuvent être classés en trois groupes : 4 lots dont les rendements de greffage vont de 10 à 20 %, 2 lots possédant des rendements de greffage de l'ordre de 40% et 2 lots dont les rendements de greffage sont d'environ 100% (Tableau 18). Les meilleurs rendements de greffage de PS sont observés pour des couches de silice de 2 et 4 Si/Gd. Pour expliquer cela, deux hypothèses peuvent être avancées : la première est le fait qu'une plus grande quantité de précurseurs silylés est utilisée lors de la synthèse de la couche de polysiloxane, ce qui permet d'avoir une plus grande quantité de PS fixés par nanoparticules ; la deuxième hypothèse est la fait que les nanoparticules ne seraient plus des objets sphériques comme elles ont été décrites précédemment mais qu'il s'agirait en fait de SRP (*Small Rigid Platform*)<sup>[351, 354]</sup> (Figure 164). Les

couches de silices les plus épaisses seraient dans ce cas plus résistantes à l'hydrolyse, ce qui impliquerait des plus faibles pertes en PS lors des phases de lavage. Le taux de 100% peut être expliqué, quant à lui, par le fait que les quantités de PS ajoutés lors de la synthèse sont de sept fois la quantité théorique requise afin de maximiser les chances d'avoir un rendement de greffage conséquent de chlorure. Cette étape pourrait être améliorée et nous proposerons des pistes dans le prochain paragraphe.

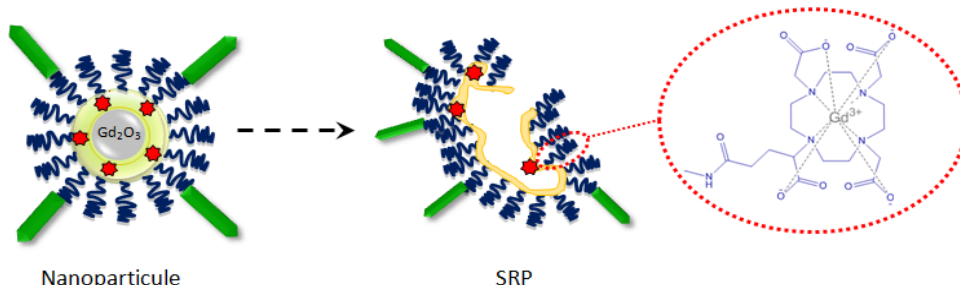


Figure 164 : Schéma théorique d'une SRP.

### - Propriétés photophysiques du PS greffé

Parmi les 9 lots greffés avec du PS, 5 lots ont montrés des rendements de fluorescence du PS et de luminescence de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> intéressants, après le greffage peptidique (Tableau 19).

Tableau 19 : Propriétés photophysiques du photosensibilisateur greffé pour les 5 lots intéressants.

Lot	Caractéristiques des nanoparticules					Nombre de TPC/Gd couplées estimées (par UV-vis à 650 nm)	Φ <sub>f</sub> avant greffage du peptide	Φ <sub>f</sub> après greffage du peptide	Φ <sub>102</sub> avant greffage du peptide	Φ <sub>102</sub> après greffage
	Type de cœur	Agent chélatant	Si/Gd	TPC/Gd	Type et taux de peptide/nanoparticule					
TPC				théo			0,21		0,65	
2	GC	DOTA	2	0,01	L10	0,004	0,17	0,15	0,50	0,44
4	PC	DTPA	4	0,1	L5	0,013	0,19	0,18	0,69	0,66
6	GC	DTPA	4	0,01	L5	0,017	0,17	0,04	0,53	0,03
11	GC	DOTA	4	0,1	0	0,040	0,11	-	0,18	-
12	PC	DTPA	2	0,01	0	0,040	0,14	-	0,23	-

Cependant, 4 lots ont montré des rendements de fluorescence de la TPC et de luminescence de l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> quasiment nuls (Tableau 20).

Tableau 20 : Propriétés photophysiques du photosensibilisateur greffé pour les 4 lots sans  $^1\text{O}_2$  détecté.

Lot	Caractéristiques des nanoparticules					Nombre de TPC/Gd couplées estimées (par UV-vis, 650 nm)	$\Phi_f$ avant greffage du peptide	$\Phi_f$ après greffage du peptide	$\Phi_{102}$ avant greffage du peptide	$\Phi_{102}$ après greffage
	Type de cœur	Agent chélatant	Si/Gd	TPC/Gd	Type et taux de peptide/nanoparticule					
TPC				théo			0,21		0,65	
1	GC	DTPA	1	0,1	L10	0,010	0,08	0,06	0	0
5	PC	DOTA	2	0,1	L5	0,017	0,07	0,02	0	0
8	PC	DOTA	4	0,1	S5	0,017	0,03	0,02	0,05	0
9	GC	DOTA	1	0,01	S5	0,033	0,04	0,02	0	0,05

Afin d'expliquer ces différences de résultats, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. En premier lieu, il peut y avoir une perte de PS lors de la phase de lavage des nanoparticules par dégradation de la silice. En second lieu, cette absence de fluorescence et de luminescence peuvent être expliquée par une agrégation des nanoparticules dans l'EtOH lors de la préparation des échantillons utilisés pour les mesures photophysiques. Enfin, ces rendements nuls peuvent également être expliqués par le *quenching* de fluorescence de la TPC et de luminescence de  $^1\text{O}_2$  du fait de l'ajout de  $\text{H}_2\text{O}$  lors de la préparation des échantillons.

Cependant, un lot du plan d'expérience (**lot 5**) qui a été testé *in vivo* et *in vitro* a montré un effet photodynamique sur des cellules MDA-MB 231, malgré l'absence de détection de  $^1\text{O}_2$ . Ce lot mériterait donc d'être synthétisé de nouveau et testé avec des sondes chimiques afin de savoir quel type de ROS est formé lors de l'excitation de ces nanoparticules.

### II. 3. a. ii. Les premiers tests biologiques

Afin de commencer à déduire les paramètres clés pour la synthèse d'une nanoparticule « idéale » il est nécessaire d'effectuer des tests *in vitro* et *in vivo* pour chaque lot du plan d'expérience. Cependant, les effets de cytotoxicité des ces nanoparticules ne peuvent pas être étudiés de façon conventionnelle, ce qui ne permet pas d'évaluer les réponses cellulaires directes et celles qui sont étalées dans le temps. Afin de remédier à ces inconvénients, une analyse originale en temps réel des cellules exposées aux nanoparticules à été utilisé afin d'étudier les effets cytotoxiques et photocytotoxiques *in vitro* des nano-objets synthétisés et utilisés durant cette thèse. Cette approche dynamique basée sur le suivi et l'analyse en temps réel de la variation d'impédance a été utilisée dans le but de caractériser la réponse de dynamique cellulaire. L'analyse en temps réel de la réponse cellulaire induite par l'exposition aux nanoparticules suivie d'une PDT nécessite l'utilisation d'un nouveau modèle permettant de décrire ces réponses photoinduites.

Une étude *in vitro*, menée par Benachour et al., réalisée sur des cellules de cancer du sein du type MBA-MB-231 (surexprimant NRP-1) a démontré l'efficacité photodynamique des nanoparticules multifonctionnelles du **lot 5** ainsi que leur capacité à cibler le récepteur NRP-1 par l'intermédiaire d'une fonctionnalisation via le peptide ATWLPPR. Les lots 5 et 13 ont été retenus pour cette étude (Figure 165). Ces lots ont été choisis de part leurs compositions chimiques très proches. Le spectre UV-visible du lot 5 montre un spectre similaire à celui de la TPC-COOH, ce qui confirme la présence effective du PS à l'état

monomère. La différence de potentiel zêta entre le lot 5 et le lot 13 est expliquée par la présence du PS et du peptide pour le lot 5 par rapport au lot 13 (contrôle).

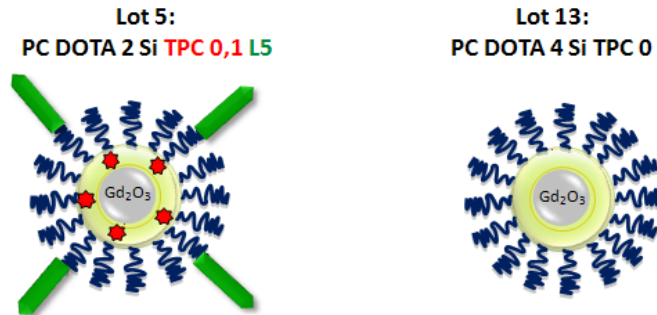
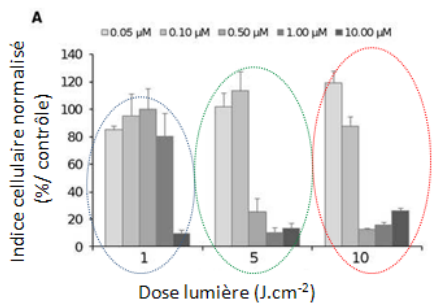


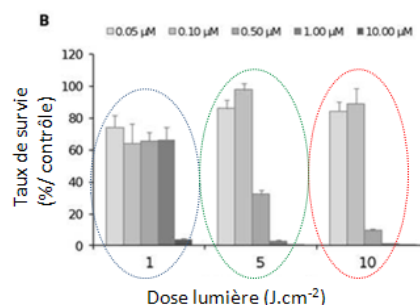
Figure 165 : Schémas des nanoparticules du lot 5 et du lot 13.

La relation entre cette efficacité photodynamique, la concentration de photosensibilisateur et la dose lumière a été mise en évidence par un test métabolique colorimétrique classique et également par un suivi de l'impédance cellulaire en temps réel grâce au système dédié XCELLigence (ou RTCA pour *real time cell analysis SP*) (Figure 166, Figure 167).



Système xCELLigence (mesure d'impédance)

Figure 166 : Indice cellulaire normalisé en fonction de la concentration et de la dose lumière obtenu avec le système XCELLigence, adapté de la référence [2].



Test métabolique WST-1

Figure 167 : Indice cellulaire normalisé en fonction de la concentration et de la dose lumière obtenu avec un test WST-1, adapté de la référence [2].

Ces nanoparticules ont été caractérisées par un effet cytotoxique en utilisant le test métabolique à la plus forte concentration (TPC-Gd : 10 μM - 585 μM, respectivement) (Figure 168). Le test MTT mesurant l'activité mitochondriale et le test RTCA évaluant simultanément la prolifération des cellules, la modification d'adhérence et le changement morphologique (Figure 169), nous pouvons considérer que les deux approches sont complémentaires. Un test de compétitivité entre le facteur de croissance VEGF<sub>165</sub> lié aux NRP-1 et les nanoparticules greffées avec ATWLPPR a également montré que ces nanoparticules déplacent fortement les VEGF<sub>165</sub> des récepteurs NRP-1. Ceci indique une plus grande affinité des nanoparticules greffées avec le peptide ligand, pour NRP-1, par rapport au ligand biologique.

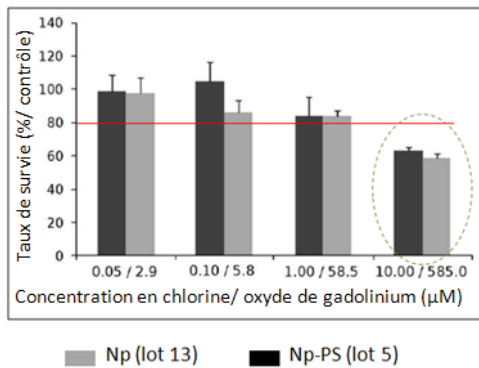


Figure 168 : Taux de survie cellulaire en fonction du type et de la concentration en nanoparticules, adapté de la référence [2].

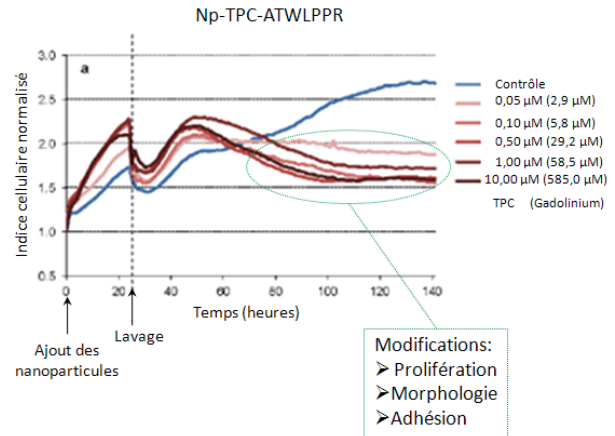


Figure 169 : Graphique de l'évolution cellulaire en fonction du temps et de la concentration en nanoparticules, adapté de la référence [2].

De plus, des études *in vivo* sur des rats *nude* portant une tumeur cérébrale orthotopique humaine de type U87 (glioblastome) dans leur hémisphère cérébral droit ont été injectés avec ces nanoparticules multifonctionnelles. Ils ont montré une accumulation intratumorale de ces nano-objets et une augmentation de contraste positif en IRM associée à une augmentation de la rétention intratumorale des nanoparticules (Figure 170).

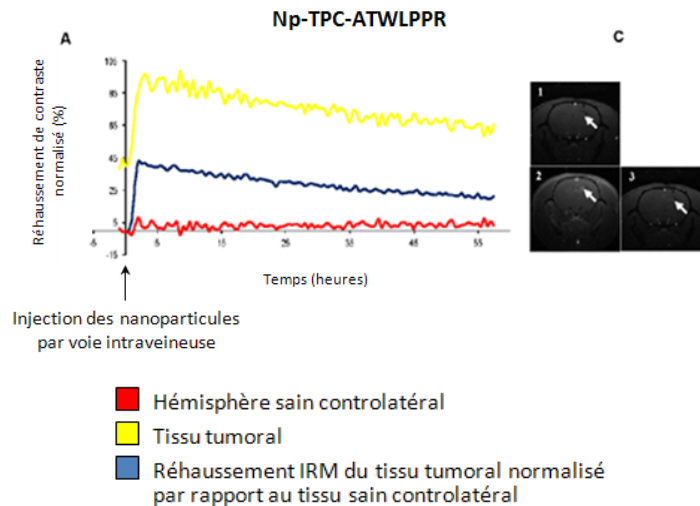


Figure 170 : Signal de réhaussement IRM obtenu avec les nanoparticules du lot 5, adapté de la référence [2].

Ces résultats sont développés de façon plus détaillée dans la publication insérée ci-après.

## Research Paper

## Multifunctional Peptide-Conjugated Hybrid Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy and MR

Hamanou Benachour<sup>1,2</sup>, Aymeric Sève<sup>3</sup>, Thierry Bastogne<sup>1,2,4</sup>, Céline Frochet<sup>3,5</sup>, Régis Vanderesse<sup>6,7</sup>, Jordane Jasniewski<sup>8</sup>, Imen Miladi<sup>9,10</sup>, Claire Billotey<sup>9,10,11</sup>, Olivier Tillement<sup>9,10</sup>, François Lux<sup>9,10</sup>, Muriel Barberi-Heyob<sup>1,2,5,12</sup>

1. Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Campus Sciences, BP 70239, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54506, France
2. CNRS, CRAN, UMR 7039, France
3. CNRS, LRGP, UPR 3349, 1 rue Grandville, Nancy, 54000, France
4. Inria, BIGS, France
5. CNRS, GdR 3049 Photomed, France
6. Université de Lorraine, LCPM, UMR 7568, Nancy, 54000, France
7. CNRS, LCPM, UMR 7568, France
8. Université de Lorraine, LIBio, INPL-ENSAIA, 2, avenue de la forêt de Haye, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54516, France
9. Université Claude Bernard Lyon 1, LPCML, UMR 5620, Villeurbanne Cedex, 69622, France
10. CNRS, LPCML, UMR 5620, France
11. Hospices Civils de Lyon, Lyon, 69000, France
12. Centre Alexis Vautrin, CRLCC, avenue de Bourgogne, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54511, France

Corresponding author: Muriel Barberi-Heyob. CRAN, UMR 7039, CNRS, Université de Lorraine, Centre Alexis Vautrin, Brabois, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. E-mail : m.barberi@nancy.unicancer.fr. Phone: +33 3 83 59 83 76. Fax: +33 3 83 59 83 78

© Ivyspring International Publisher. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>). Reproduction is permitted for personal, noncommercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited.

Received: 2012.06.18; Accepted: 2012.08.14; Published: 2012.09.29

### Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is an emerging theranostic modality for various cancer as well as non-cancer diseases. Its efficiency is mainly based on a selective accumulation of PDT and imaging agents in tumor tissue. The vascular effect is widely accepted to play a major role in tumor eradication by PDT. To promote this vascular effect, we previously demonstrated the interest of using an active-targeting strategy targeting neuropilin-1 (NRP-1), mainly over-expressed by tumor angiogenic vessels. For an integrated vascular-targeted PDT with magnetic resonance imaging (MRI) of cancer, we developed multifunctional gadolinium-based nanoparticles consisting of a surface-localized tumor vasculature targeting NRP-1 peptide and polysiloxane nanoparticles with gadolinium chelated by DOTA derivatives on the surface and a chlorin as photosensitizer. The nanoparticles were surface-functionalized with hydrophilic DOTA chelates and also used as a scaffold for the targeting peptide grafting. In vitro investigations demonstrated the ability of multifunctional nanoparticles to preserve the photo-physical properties of the encapsulated photosensitizer and to confer photosensitivity to MDA-MB-231 cancer cells related to photosensitizer concentration and light dose. Using binding test, we revealed the ability of peptide-functionalized nanoparticles to target NRP-1 recombinant protein. Importantly, after intravenous injection of the multifunctional nanoparticles in rats bearing intracranial U87 glioblastoma, a positive MRI contrast enhancement was specifically observed in tumor tissue. Real-time MRI analysis revealed the ability of the targeting peptide to confer specific intratumoral retention of the multifunctional nanoparticles.

Key words: Targeted PDT; neuropilin-1; brain tumor; MRI; functionalized theranostic nanoparticles



## Introduction

Both cancer diagnosis and treatment depend on selective delivery of appropriate agents to the malignant tissues. Photodynamic therapy (PDT) is an increasingly recognized theranostic alternative to treat a variety of cancer diseases. This technique involves the preferential uptake of photosensitizing molecules, also known as photosensitizers, by target tissue followed by localized photoirradiation with visible light at an appropriate wavelength and dosage. Photo-activation of the photosensitizer results in the formation of photosensitizer excited state that transfers its energy to surrounding molecular oxygen to locally generate reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen ( $^1O_2$ ), which damage target tumor cells and vasculature inducing tumor cells death [1-3]. Nevertheless, the clinical efficacy of PDT is often limited by the difficulty in systemic administration of mostly hydrophobic photosensitizers. The most commonly used photosensitizing agents are porphyrin-based molecules [4]. Many of them are limited because of poor water solubility, prolonged cutaneous photosensitivity, inadequate pharmacokinetics and low tumor selectivity [5]. To overcome these limitations, numerous approaches have been proposed to direct the photosensitizer to tumor by active targeting strategies, including conjugation to specific antibodies and receptor peptide ligands [6-8], and encapsulation of the photosensitizer within nano-sized carriers, such as emulsions, liposomes, and nanoparticles to enhance their water solubility and deliver higher local concentrations at the tumor tissue [9-11].

In this aim, vascular targeted PDT also appears as a promising targeting approach in cancer treatment that has received considerable attention [12, 13]. Destruction of the vasculature may indirectly lead to tumor eradication, following deprivation of life-sustaining nutrients and oxygen [14, 3], and this vascular effect is thought to play a major role in the destruction of some vascularized tumors by PDT [15, 13, 16]. Therefore, tumor neovasculature known to express specific molecular markers [17] is a potential target of PDT damage. We have previously described the conjugation of a chlorine-type photosensitizer (TPC) to an heptapeptide (ATWLPPR), specific for the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor, neuropilin-1 (NRP-1) [18, 19]. We evidenced the implication of NRP-1 in the cellular incorporation of the conjugate [20], and its *in vitro* efficiency as compared to non-targeted form [19]. *In vivo* evaluation demonstrated the interest of using this active-targeting strategy, allowing efficient and selective accumulation of the conjugated photosensitizer in endothelial cells

of tumor vessels [21, 22]. Although the peptide-conjugated photosensitizer improved the tumor-targeting efficacy, we observed a degradation of the peptide in plasma from 2 h post-intravenous injection and biodistribution findings suggested that its appearance in plasma mainly resulted from the degradation of the peptidic moiety into organs of the reticulo-endothelial system [20, 23].

The use of biocompatible nano-carriers as platforms to deliver photosensitizing and imaging agents has been reported to improve PDT efficiency and cancer detection [24-27]. Nanoparticles not only allow delivering of large amount of PDT and imaging agents, but can also be tailored to an appropriate size for enhancing their passive preferential accumulation in tumor tissue owing to the "enhanced permeability and retention effect" [28]. Due to their surface area, nanoparticles can be functionalized with various functional groups with diverse array of chemical and biochemical properties, including tumor selective ligands for active targeting strategies. We previously reported that hybrid silica-based nanoparticles seem to be very promising delivery systems satisfying all the requirements for an ideal targeted PDT [29, 30]. Among them, hybrid gadolinium oxide nanoparticles have been suggested as very attractive system aiming to combine magnetic resonance imaging (MRI) and treatment [31, 32, 33]. We recently described the synthesis and photophysical characteristics of multifunctional silica-based nanoparticles consisting of a surface-localized tumor vasculature targeting peptide and encapsulated PDT and imaging agents [34]. *In vitro* investigations revealed that peptide-functionalized nanoparticles specifically bound to NRP-1 recombinant protein, and conferred photosensitivity to cells over-expressing this receptor, demonstrating that the photosensitizer covalently grafted within the nanoparticle matrix can be photo activated to induce cytotoxic effects *in vitro* [34]. *In vitro* characterization studies of these nanoparticles revealed a photodynamic efficiency in a concentration-dependent manner, providing direct evidence that the conjugated photosensitizer in the nanoparticle matrix could be photoactivated to yield cytotoxic reactive oxygen species.

In the present study, we described the development and the *in vitro* and *in vivo* evaluation of novel multifunctional nanoplatfoms consisting of a surface-localized tumor vasculature targeting NRP-1 and encapsulated PDT and imaging agents, as potential theranostic system for PDT and imaging of cancer. We optimized peptide-targeted silica-based small nanoparticles grafted by gadolinium chelates for MRI and a chlorine as a photosensitizer. Multifunctional nano-



particles were evaluated *in vitro*, demonstrating an efficient photodynamic activity on cancer cells, related to the photosensitizer concentration and light dose, and their ability to target NRP-1 recombinant protein. *In vivo* studies on rats bearing an orthotopic human brain tumor (U87) revealed a tumor-tropic accumulation of the multifunctional nanoparticles, providing a tumor positive MRI contrast enhancement and highlighted the role of the peptide-targeted nanoparticle in the intratumoral retention of the nanoparticles.

## Materials and Methods

### Nanoparticles synthesis and functionalization

The approach developed is based on multifunctional silica-based nanoparticles consisting of a surface-localized tumor vasculature targeting NRP-1 peptide and gadolinium chelates as MRI contrast agent and encapsulated a chlorin as photosensitizer. Multifunctional silica-based nanoparticles were designed, consisting of a surface grafted tumor targeting peptide H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (called ATWLPPR) and encapsulated a photosensitizer (a chlorin, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin, TPC) and a MRI contrast agent (gadolinium DOTAGA), and noted NP-TPC-ATWLPPR. Nanoparticles without photosensitizer and surface targeting peptide were also synthesized and considered as control, noted NP. The synthesis of Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles embedded in a polysiloxane shell has been widely described previously by our group [35-37, 32]. The top down process leading from the gadolinium oxide particles to the ultrasmall polysiloxane particles with gadolinium chelates at the surface has been recently published [33].

**Preparation of gadolinium oxide core:** Gadolinium chloride salt (3.346 g, GdCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) was placed in 60 mL of diethylene glycol (DEG) at room temperature under vigorous stirring. The suspension was heated at 140°C until the total dissolution of gadolinium chloride salt (about 1 h). When the solution was clear, 0.3 equivalent volume of sodium hydroxide solution (1.33 mL, 2.03 M) was added drop by drop under vigorous stirring. Afterwards, the solution was heated and stirred at 180°C for 3 h. A transparent colloid of gadolinium oxide nanoparticles was obtained and brought back to room temperature before storage at -18°C.

**Peptide synthesis:** The synthesis of H-AT(tBu)W(Boc)LPPR(Pbf)-OH peptide, called protected ATWLPPR, was carried out on a fully automated ResPepXL synthesizer (Intavis AG, Köln, Germany) according to a classical 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl (Fmoc)/tBu sol-

id-phase methodology. Details of the method were previously described by our group [38, 34].

**Photosensitizer synthesis:** 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin (TPC) was synthesized as described by Whitlock [39] and our group [40] as well as 5,10,15-tri-(p-tolyl)-20-(p-carboxyphenyl)chlorin-succinidyl ester (TPC-NHS).

**Grafting of TPC-NHS into polysiloxane shell and coating of gadolinium oxide cores by the grafted polysiloxane shell:** A solution containing TPC-NHS (26.4 μmol) and two equivalents of aminopropyltriethoxysilane (APTES, 52.8 μmol) dissolved in 2.5 mL of dimethylsulfoxide (DMSO) was prepared as a precursor TPC-APTES and stirred for 2 h at room temperature. The silane precursors (APTES (0.75 mL) and triethoxy silane (TEOS, 0.5 mL)) and hydrolysis solution (aqueous Et<sub>3</sub>N in DEG (1.07 M of triethylamine (TEA), 0.75 M of water)) were sequentially and alternatively added to 60 mL DEG solution containing Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles ([Gd]=45 mM) under stirring at 40°C. The whole addition of silane precursors and hydrolysis solution is performed in 4 steps. Each step consists in the addition to the colloid of a portion of the silane precursors mixture (25% for each step) followed by the addition of hydrolysis solution mixture (25% for each step). The solution of TPC-APTES is added in the first step with the other silane precursors. The delay between both additions is 24 h. After the last addition, the final mixture was stirred for 48 h at 40°C.

**Functionalization of the polysiloxane shell by DOTAGA:** To facilitate the dispersion of the particles in biological media in one hand, and to provide chemical functions allowing further functionalization of the nanoparticles (i.e. with targeting peptide) in the other hand, DOTAGA chelate (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4,7,10-triacetic) acid was covalently grafted at the surface of the polysiloxane shell. DOTAGA is coupled to the nanoparticles through an amide link by the reaction with the amine functions of the APTES. DOTAGA (1.47 g, DOTAGA/APTES ratio is 1.0) in 6 mL of anhydrous DMSO is added to 60 mL of the precedent colloidal solution and stirred for 1 h. DOTAGA was furnished by Chematech (France).

**Covalent grafting of the protected peptide on DOTA-nanoparticles:** To prepare the nanoparticles grafted with peptide, 1.64 × 10<sup>-8</sup> mol of gadolinium in DOTA-nanoparticles was dispersed in 7 mL of water/dimethylsulfoxide (DMSO), 1/1, v/v. The DOTA carboxylic acid functions were first activated by 5 equivalents of a mixture EDC/HBTU, 1/1, (EDC, 8.2 × 10<sup>-8</sup> mol, 16 μg, HBTU 8.2 × 10<sup>-8</sup> mol, 32 μg, DIEA 10 μL). The mixture was stirred during 10 min before

addition of 122.8  $\mu\text{g}$  ( $9.84 \times 10^{-8}$  mol) protected peptide ATWLPPR. After 18 h at room temperature under stirring, water and DMSO were evaporated and 5 mL of pure trifluoroacetic acid (TFA) was added to deprotect the side chains of the peptide. The stirring was carried on during 2 h at room temperature. Ultrapure water was added and the solvents were evaporated. Several cycles of addition of water and evaporation were realized to eliminate most of TFA and DMSO. The purification of the peptide-functionalized nanoparticles was realized first by dialyses with a 5000 Da cellulose membrane against ultrapure water, secondly by several cycles of dialysis during 2 h or 3 h each followed by ultrafiltrations with Vivaspin® (MCWO 5000 Da) during 7 min at 3500 g. Finally, the water was removed under vacuum and the concentration of the nanoparticles was adjusted. Thanks to the fluorescence of the tryptophan residue (excitation and emission wavelengths at 280 and 350 nm, respectively); it was possible to estimate the number of grafted peptide onto the nanoparticles. The number of the peptide units coupled to the nanoparticles has been estimated by comparing the fluorescence of the tryptophan of the peptide coupled to the nanoparticle to a fluorescence calibration curve of the peptide in solution.

#### Photon Correlation Spectroscopy (PCS) and zeta potential measurements

PCS and Zeta potential measurements were performed with a Zetasizer Nano ZS (Malvern, England) equipped with a 532 nm frequency doubled DPSS laser, a measurement cell, a photomultiplier and a correlator. Scattering intensity was measured at a scattering angle of  $173^\circ$  relative to the source using an avalanche of photodiode detector. Prior to analysis, nanoparticles were suspended in ultrapure water and adjusted to pH  $\sim 7.0$ . 1 ml of nanoparticles sample at 5 mM of gadolinium was measured in a clear disposable Zeta cell (DTS1060 Malvern). The measurements were made at a position of 5.50 mm and 2.00 mm from the cuvette wall for the PCS or Zeta potential measurements, respectively, with an automatic attenuator and at a controlled temperature of  $20^\circ\text{C}$ . This setup allows considerable reduction of the signal due to multiple scattering events and enables working in slightly turbid media. Intensity autocorrelation functions were analysed by CONTIN algorithm in order to determine the distribution of translational z-averaged diffusion coefficient of particles,  $D_T$  ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). The  $D_T$  parameter is related to the hydrodynamic radius ( $R_h$ ) of particles through the Stokes-Einstein relationship:

$$D_T = k_B T / 6\pi\eta R_h$$

where  $\eta$  is the solvent viscosity (Pa.s),  $k_B$  is the Boltzmann constant ( $1.38 \times 10^{-23}$  N.m.K $^{-1}$ ),  $T$  is the absolute temperature ( $^\circ\text{K}$ ) and  $R_h$  (m) is the equivalent hydrodynamic radius of a sphere having the same diffusion coefficient than the particles [41]. For each sample, 15 runs of 10 s were performed with three repetitions.

#### Photophysical properties

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda 35, Courtaboeuf, France) UV-visible spectrophotometer. Fluorescence spectrum were recorded on a SPEX Fluorolog-3 spectrofluorimeter (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermo stated cell compartment ( $25^\circ\text{C}$ ), using a 450 W Xenon lamp. The spectra were performed on suspensions of samples (nanoparticles and free TPC) prepared in ethanol.

#### Binding of functionalized nanoparticles to recombinant NRP-1 protein

A competitive binding assay was used. Neupilin-1 was obtained from R&D Systems (Lille, France), as recombinant chimeric protein. The surface of Maxisorp microplates (Dutscher) was coated with NRP-1 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in phosphate buffered saline (PBS) overnight at room temperature. After washing (PBS containing 0.05% Tween 20), the plates were blocked with PBS containing 0.5% bovine serum albumine (BSA, blocking buffer) during 1h at  $37^\circ\text{C}$ , to prevent non-specific interactions. Binding of the functionalized nanoparticles to NRP-1 was assessed using 5 ng/mL of biotinylated VEGF $_{165}$  (R&D Systems) in blocking buffer containing 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparin. Biotinylated VEGF $_{165}$  was added to the coated wells in the absence or presence of increasing concentrations of NP-TPC-ATWLPPR or control NP as competitors, or large excess of unlabelled VEGF $_{165}$  as positive control (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , R&D Systems). After a 2 h-incubation at room temperature, the wells were washed and the amount of bound biotinylated VEGF $_{165}$  was stained with streptavidin horseradish peroxidase conjugate (R&D Systems) for 20 min at room temperature. Following a wash to remove unbound enzyme conjugate, a substrate solution (R&D Systems) was added. After 30 min at room temperature, reaction was stopped by the addition of Stop Solution (R&D Systems) and optical densities were measured at 450 nm against a background control containing only blocking buffer, using a Multiskan microplate reader (Labsystem, Cergy-Pontoise, France). Results were expressed as relative absorbance to negative control without any competitor. Reported values are the average of triplicate measurements.



### Cell line and culture

To investigate the potential of functionalized nanoparticles to induce *in vitro* photodynamic effect on tumor cells, MDA-MB-231 human breast cancer cells over-expressing the vascular neuropilin-1 (NRP-1) receptor were used. MDA-MB-231 cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were routinely grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1664) medium (Invitrogen, France) supplemented with 9% heat-inactivated fetal bovine serum (PAN<sup>TM</sup> Biotech GmbH, Germany), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen, France), and 2 mM L-Glutamine (Invitrogen, France) in a controlled atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidified air at 37°C in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks. Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France).

### In vitro cytotoxicity and photodynamic activity

*In vitro* cytotoxicity and photo-induced cytotoxicity of the synthesized nanoparticles were investigated using the metabolic-based cell viability assay (MTT) and the real-time impedance-based analysis.

**Real-time impedance-based cell analysis:** MDA-MB-231 cells attachment, proliferation and size variations were monitored in real-time and measured as impedance using 96-well E-Plates<sup>TM</sup> and the xCELLigence system (Real Time Cell Analyzer Single Plate (RTCA SP<sup>®</sup>) system). The xCELLigence system was developed to monitor cell proliferation in real-time, without incorporation of dyes, by measuring electrical impedance created by cells across the high-density electrode array coating the bottom of the wells [42]. Impedance value is automatically converted to Cell Index (CI) value that is defined as relative change in electrical impedance, created by attached cells, to represent cell status, and is directly proportional to number, size, and attachment forces of the cells.

Background impedance of the E-Plate was first determined before seeding the cells by the addition of 50 µL culture medium to each well, and subtracted automatically by the RTCA software following the equation:  $CI = (Z_t - Z_0) / 15$  with  $Z_t$  as the impedance at any given time point and  $Z_0$  as the background signal [43]. Subsequently, a 150 µL cell suspension containing 10<sup>4</sup> MDA-MB-231 cells was seeded in each well, and allowed to settle at the bottom of wells for 20 min before starting impedance measurement in 15 min intervals. 24 h after seeding, 10 µL of growth medium without or with increasing final concentrations of photosensitizer (0.05, 0.10, 0.50, 1.00 or 10.00 µM) in NP-TPC-ATWLPPR or the corresponding final concentrations of gadolinium (2.9, 5.8, 29.2, 58.5 or 585.0

µM) for the control NP was added in each well, and the cultures were kept in darkness. Each concentration was tested in sixplicate. To allow nanoparticles internalization, the cells were grown for further 24 h during which impedance was measured every 15 min. The cells were then washed three times with growth medium and the medium was renewed by 150 µL fresh growth medium. The cell growth was then monitored for the indicated time, and impedance was measured every 15 min. Before, cells were either exposed to various doses of light (1, 5, or 10 J/cm<sup>2</sup>) using a diode laser, Ceralas PDT 652 (CeramOptec GmbH, biolitec, Germany) to assess the photo-induced cytotoxicity of the NP-TPC-ATWLPPR, or let without irradiation to determine their cytotoxicity in darkness. Irradiation was carried out at 652 nm with an irradiance of 4.54 mW/cm<sup>2</sup>. Based on impedance measurements, cell index values were automatically derived and recorded as a function of time from the time of plating until the end of the experiments.

**MTT assay:** Cell proliferation and survival after incubation with various concentrations of nanoparticles without or with light irradiation was also measured using a single-point metabolic-based assay; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Briefly, MDA-MB-231 cells were plated in sixplicate at a density of 4 x 10<sup>3</sup> cells per well in 96-well flat-bottomed microtiter plates in the volume of 200 µL per well, and let to adhere in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Forty-eight hours after plating, wells were emptied and 200 µL of fresh medium without or with nanoparticles at the indicated concentrations of photosensitizer (in NP-TPC-ATWLPPR) or the corresponding concentrations of gadolinium for the control NP without TPC and without peptide (NP) was added in each well. After a 24 h-incubation at 37°C, the medium was removed and cells were washed three times with fresh medium, and 150 µL of medium were added. The cells were then either exposed to various doses of light (1, 5, or 10 J/cm<sup>2</sup>) using a diode laser, Ceralas PDT 652 (CeramOptec GmbH, biolitec, Germany) to assess the photodynamic activity of the nanoparticles, or let without irradiation to determine their cytotoxicity in darkness. Following a further 24h-incubation at 37°C, cell survival was then measured as described previously [44]. Cell viability was expressed as the percentage of the controls cultivated under the same conditions without nanoparticles exposure.

### Animals and tumor xenograft model

Male athymic nude rats (mean weight 100 g, rnu/rnu, homozygous) purchased from Harlan (Harlan, Gannat, France) were used in the present

study. Animal care and studies were performed according to the guidelines of the French Government (degree 87-848 of October 19, 1987) and approved by our institutional agreement number (C 54-547-03). Rats were housed in an isolation facility at 25°C and fed a standard pellet diet and provided water *ad libitum*. U87 human glioblastoma cells were stereotactically implanted into the right brain hemisphere. For tumor implantation, rats (8 week-old, 180-200g weight at the time of implantation) were anesthetized by an intraperitoneal (*i.p.*) injection of a mixture of ketamine/xylazine (90/10 mg/kg respectively) and immobilized in a Kopf stereotactic frame (900M Kopf Instruments, Tujunga, CA). Following a local anesthesia with Xylocain (AstraZeneca, France) and antiseptic preparation of the head, a midline incision was done and a burr hole was made in the right striatum (coordinates with regard to *bregma*: 0.5 mm anterior and 2.7 mm lateral). U87 cells were washed once with PBS (1x), trypsinized, centrifuged and resuspended at  $5.10^5$  cells/5  $\mu$ L Hank's Buffered Salt Solution (HBSS, 1X). A volume of 5  $\mu$ L of cell suspension was slowly injected at a depth of 4.4 mm into the right caudal-putamen of the animal brain using a 10 $\mu$ L-Hamilton microsyringe coupled in the infusion pump (0.5  $\mu$ L/min). After injection the burr hole was closed with bone wax, the scalp incision sutured with 6.0 Prolene suture and the surface was antiseptically cleaned.

#### Nanoparticles preparation and intravenous administration

Nanoparticles were suspended in ultrapure water and NaCl 9‰ (1:1) to obtain a concentration of 100 mM Gd in iso-osmolar solution, pH ~ 7.4. The injection solution was prepared for each type of studied nanoparticles (NP-TPC-ATWLPPR or NP) by dilution in 9‰ NaCl to obtain an injection volume of 500  $\mu$ L (*e.g.* 25  $\mu$ mol of Gd for a body weight of ~ 250 g). The anesthetized rat was catheterized into the caudal vein using a microperfusor (BD Vacutainer Safety-Lok: 23G x 3/4" x 7" 0.6x19 mm x178 mm, France). The catheter was filled beforehand with 10% heparin (Heparin 25000 UI), which made it possible to check the venous return, the permeability of the catheter and to prevent its occlusion by coagulated blood. 500  $\mu$ L of the nanoparticles solution, followed by 500  $\mu$ L of 9‰ NaCl to flush the cannula line were slowly injected (during 1 min).

#### In vivo magnetic resonance imaging (MRI)

Magnetic resonance imaging of the rat brain was performed by using a 7-Tesla horizontal bore system (Biospec; Brüker, Ettlingen, Germany) equipped with

400 mT/m gradient set and a 30-mm-diameter surface coil for signal reception. Twenty days after intracranial tumor inoculation, the animal was anesthetized with a mixture of air and 4% isoflurane. Anesthesia was maintained throughout the imaging procedure with 1.5-2% isoflurane. The caudal vein was catheterized and the anesthetized animal was immediately prepared for MRI. The rat head was fixed with ear plugs and bar tooth to prevent head movement during acquisition, and respiration was continuously monitored throughout acquisition using a pressure sensitive probe positioned over the rat's diaphragm. Cerebral T2-weighted TurboRARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) spin echo sequences (4200/12 [repetition time msec/echo time msec], 0.651 mm section thickness, 2x2 cm field of view, 512-192 matrix) were acquired for solid tumor location and size estimation. To assess the kinetics of the nanoparticles in the tumor as well as the nanoparticles-enhanced MRI signal intensity, a dynamic T1-weighted flash sequences (86/3.6 [repetition time msec/echo time msec], 0.651 mm section thickness, 2x2 cm field of view, 512-192 matrix) were acquired just before injection and during 60 minutes. Following MRI analysis, rats were sacrificed and right and left hemispheres as well as other organs/tissues were dissected out and kept at -80°C for analysis of gadolinium-based hybrid nanoparticles uptake.

#### Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) analysis

A Varian 820 MS instrument (Varian, Les Ulis, France) was used to perform ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) analyses in order to evaluate biodistribution of gadolinium hybrid nanoparticles. All samples (organs and urine), dissected out from the rats bearing brain tumor, were completely dissolved with 70% HNO<sub>3</sub> (5 mL per sample) and heated at 90°C until total mineralization. Each mineralized sample was solubilised in 25 mL of milli-Q water (resistivity > 18.2 M $\Omega$ ) and analyzed by ICP-MS (Laboratoire Environnement-Hygiène of Eurofins ASCAL, Forbach, France). The ICP-MS instrument was initialized, optimized and standardized according to manufacturer recommendations.

## Results

#### Synthesis and characterization of nanoparticles

Multifunctional small nanoparticles were successfully developed consisting of a gadolinium oxide core as MRI contrast agent, which is coated by a silica shell containing the covalently encapsulated TPC



photosensitizer. The nanoparticles were surface-functionalized with DOTA as hydrophilic chelates and ATWLPPR heptapeptide as a tumor vasculature targeting NRP-1 unit. To evaluate the PDT efficiency and targeting ability of the functionalized nanoparticles, two nanoparticles batches were tested without (NP) or with (NP-TPC-ATWLPPR) TPC photosensitizer and ATWLPPR targeting peptide units.

Size distribution and Zeta potential of the nanoparticles were presented in Fig. 1A and B, respectively, and values were summarized in Table 1. Hydrodynamic diameter was 4.6 and 3.3 nm for NP-TPC-ATWLPPR and NP, respectively. Hence, one can observe that peptide grafting on the surface of nanoparticles (~3 peptides per nanoparticle) and TPC encapsulating into the silica shell (~1.7 TPC molecules per nanoparticle) induce only slight increase in the hydrodynamic diameter (4.6 vs. 3.3 nm for NP-TPC-ATWLPPR and NP, respectively). The two nanoparticles batches were characterized by a single narrow peak with around 99.5% of the size distribution by volume (Fig. 1A). This indicates that the nanoparticles were monodisperse in water probably because of their derivatization by the DOTA polymers. Zeta potentials were also determined in ultrapure water to avoid the presence of counterions which could neutralize the charges on the nanoparticles. Positive charge of  $12.9 \pm 4.0$  and  $4.3 \pm 3.5$  mV was measured for NP-TPC-ATWLPPR and NP, respectively (Fig. 1B and Table 1). As suggested by our group [34], the higher positive charge of the peptide-conjugated nanoparticles ( $12.9 \pm 4.0$  mV) may be brought by the surface-grafted peptide ATWLPPR (~3 peptides per nanoparticle). UV/Vis spectra of the NP-TPC-ATWLPPR nanoparticles showed that the nanoparticles displayed similar absorption features to free TPC, with the Soret-band and the respective Q-bands (Fig. 1C). No shift of the maximum absorption at Soret-band can be observed, suggesting that the photosensitizer was mainly in a monomeric form without aggregation inside the nanoparticles. This indicates that the photophysical properties of TPC molecules in the nanoparticles were well retained. According to the calibration curve of the UV/Vis absorption spectra of free TPC, the amount of grafted TPC within the nanoparticles NP-TPC-ATWLPPR was estimated around 1.7 TPC molecules per nanoparticle. According to the calibration curve of the fluorescence spectra of free peptide and the fluorescence of the peptide coupled to the nanoparticles in solution, we quantified ~3 peptides per nanoparticle.

Table 1. Size and zeta potential of nanoparticles

Nanoparticles types	NP TPC ATWLPPR	NP
Hydrodynamic diameter (nm)	4.6±3.8	3.3±1.1
Zeta potential (mV)	12.9±4	4.3±3.5

#### Molecular affinity of peptide-conjugated nanoparticles

The endothelium-homing peptide ATWLPPR was described to selectively target NRP-1 receptor expressed in angiogenic vasculature [19, 20, 22]. The molecular affinity of the nanoparticles for recombinant NRP-1 protein was evaluated using competitive binding test. Increasing concentrations of peptide conjugated to NP-TPC-ATWLPPR nanoparticles or the corresponding concentrations of gadolinium in the control NP were tested. Results of binding test were presented in Fig. 2. Biotinylated VEGF<sub>165</sub> bound to NRP-1 was greatly displaced by the peptide-conjugated nanoparticles NP-TPC-ATWLPPR, indicating that the conjugated nanoparticles bound to recombinant NRP-1 chimeric protein. Although slight interaction of the un-conjugated NP was only detected with the higher concentration tested, ATWLPPR-conjugated nanoparticles showed a peptide concentration-dependent binding to recombinant NRP-1 protein ( $EC_{50} = 56.6 \mu\text{M}$  for NP-TPC-ATWLPPR, corresponding to the concentration of competitor that displaced 50% of VEGF<sub>165</sub> binding).

#### Nanoparticles-induced dark cytotoxicity in vitro

Dark cytotoxicity (without light irradiation) was first assessed by MTT test on the MDA-MB-231 breast cancer cells, overexpressing NRP-1 receptor [38]. Increasing concentrations of nanoparticles-grafted photosensitizer molecules (NP-TPC-ATWLPPR) or photosensitizer-free nanoparticles (NP) (from 0.05 to 10.00  $\mu\text{M}$  of TPC, corresponding to 2.9 to 585.0  $\mu\text{M}$  of gadolinium oxide, respectively) were tested (Fig. 3). As shown on Figure 3A, 48 h after nanoparticles exposure, cytotoxic effect was evidenced only with the higher concentration (10.00  $\mu\text{M}$ /585.0  $\mu\text{M}$ ) leading to a reduction of 37% and 41% of cell survival for NP-TPC-ATWLPPR and NP, respectively. No cytotoxic effect was measured (mean cell viability superior to 80%) for cells exposed with concentrations from 0.05 to 1.00  $\mu\text{M}$  for both nanoparticle groups (NP-TPC-ATWLPPR and NP) compared to untreated cells (Fig. 3A).

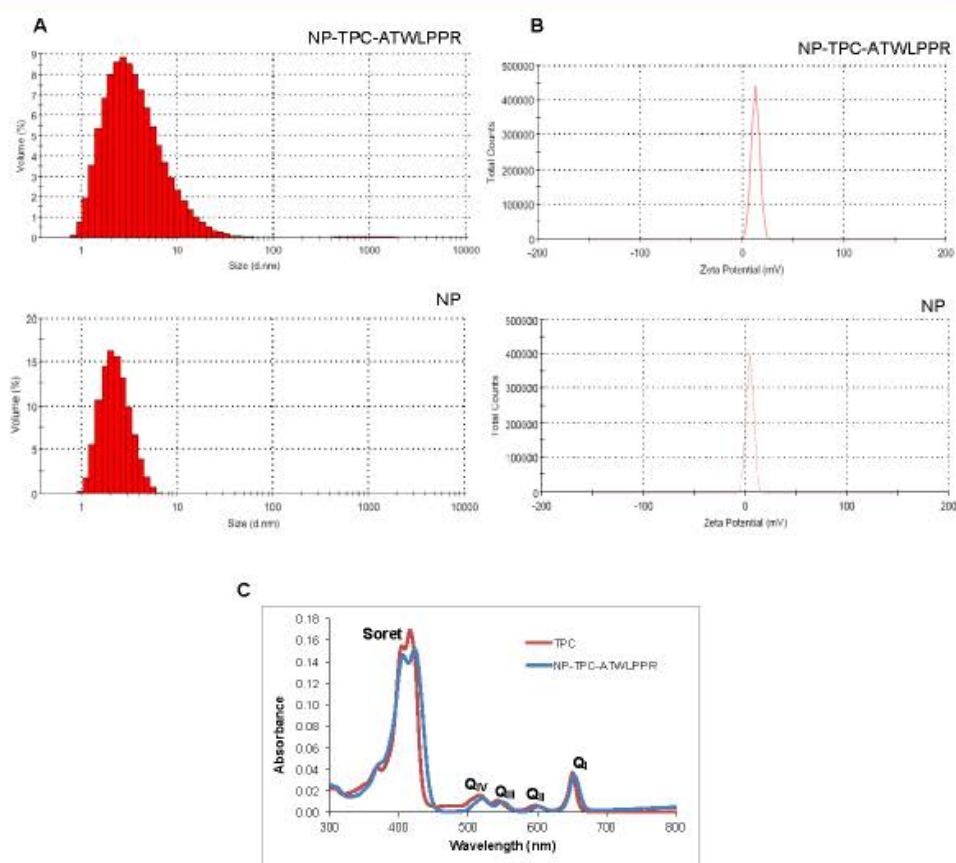
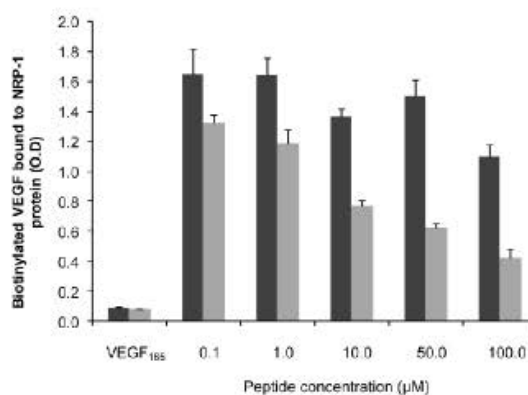


Figure 1. Absorption spectra, size and zeta potential of gadolinium-based hybrid silica nanoparticles. (A) Size distribution by volume of the hydrodynamic diameter (expressed in nm) of nanoparticles (NP-TPC-ATWLPPR or NP) in suspension at 20°C. (B) Zeta potential distribution (expressed in mV) of the nanoparticles (NP-TPC-ATWLPPR or NP) suspensions. (C) Absorption spectra of free photosensitizer TPC and suspension of NP-TPC-ATWLPPR nanoparticles in ethanol.

Figure 2. Binding of ATWLPPR-targeted (NP-TPC-ATWLPPR) and untargeted (NP) nanoparticles to NRP-1 recombinant protein. Binding of the biotinylated VEGF (5 ng/mL) to recombinant chimeric NRP-1 protein, in the presence of 2 µg/mL heparin, was evaluated in competition with an excess of VEGF<sub>165</sub> as positive control (0.5 µg/mL), NP-TPC-ATWLPPR (grey) or NP control (black) at the indicated concentrations of ATWLPPR or the corresponding concentrations of gadolinium (Gd), respectively. Data points show the mean ± SD., n=3. EC<sub>50</sub> = 56.6 µM (NP-TPC-ATWLPPR)



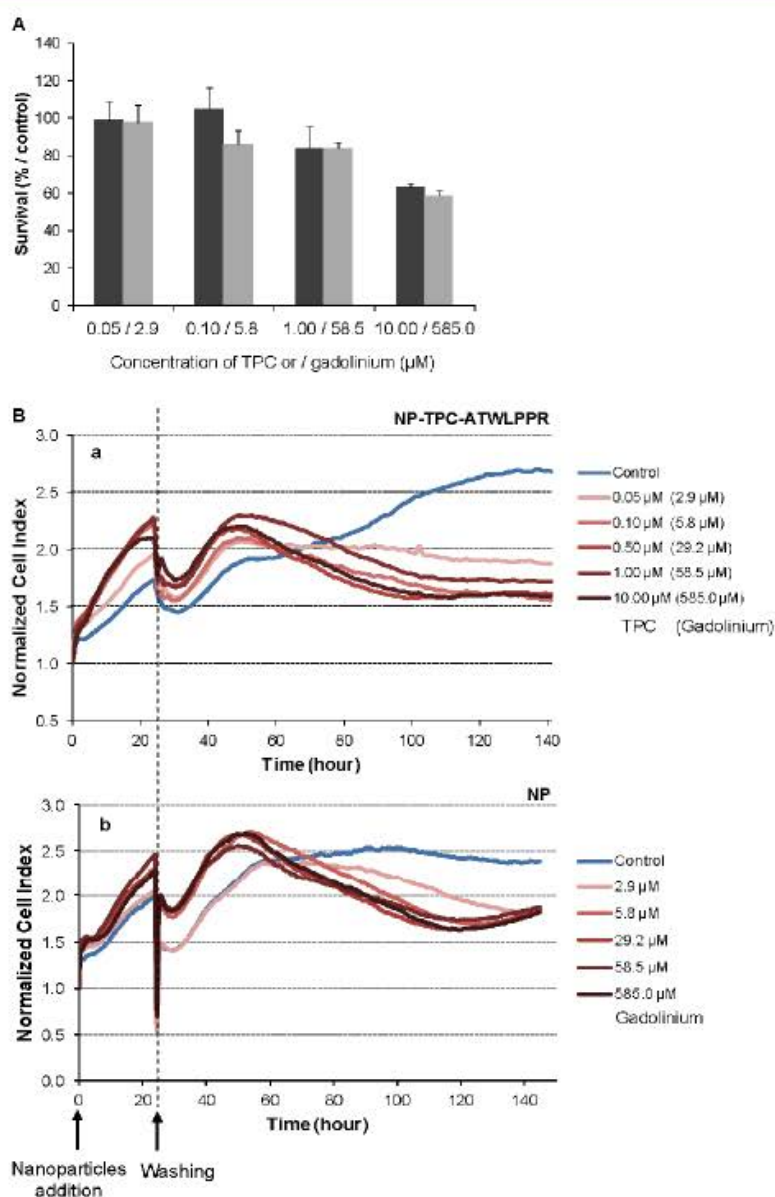


Figure 3. Impact of nanoparticles-containing photosensitizer and peptide (NP-TPC-ATWLPPR) or nanoparticles only (NP) on MDA-MB-231 cell activities in darkness. A) MDA-MB-231 cells were exposed to NP-TPC-ATWLPPR (black) or NP (gray) at the indicated concentrations for 24 h at 37°C. Cells were washed and incubated at 37°C for further 24 h. Cell viability was then measured using MTT test (values are presented as the mean  $\pm$  SD). B) Kinetics of the normalized cell index of the MDA-MB-231 cells exposed to various concentrations of NP-TPC-ATWLPPR (a) or the corresponding concentrations of gadolinium in the control NP (b) for 24h before washing. Cell index was monitored during 143 h after nanoparticles exposure by using the xCELLigence system. All reported data are the means of six replicates.



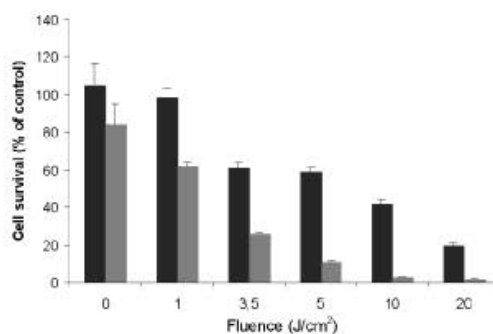
We also used a real-time cell analysis system to investigate the dynamics of cytotoxic effects of multifunctional ultrasmall nanoparticles. RTCA system measures impedance-based signals and provides dynamic information about cell response. The cellular response was continually monitored for 143 h in darkness from the time of nanoparticles addition. As shown in **Figure 3B**, electrical impedance measurements from adherent cells, expressed as normalized cell index kinetics, showed no decrease in cell index values whatever the nanoparticles type (NP and NP-TPC-ATWLPPR) concentration used as compared to untreated cells. A transient decrease of cell index was recorded at 24 h-post addition, related to the temporary interruption of impedance measurement during the washing step performed to washing off the un-internalized nanoparticles. However, from ~ 60 h after nanoparticles exposure, cell index kinetics were clearly modified displaying an evident time-dependent decrease of cell index for all the concentrations tested, suggesting a late cellular effect on cell proliferation.

#### In vitro photodynamic activity of nanoparticles

On the basis of the data obtained from the dark cytotoxicity studies using MTT test (**Fig. 3A**), photodynamic activity was investigated with two non cytotoxic concentrations of TPC (0.1 and 1.0  $\mu\text{M}$ ) into the nanoparticles NP-TPC-ATWLPPR. MDA-MB-231 cancer cells were exposed to 0.1 and 1.0  $\mu\text{M}$  of TPC into NP-TPC-ATWLPPR for 24 h. Following washing, the cells were irradiated with various doses of red light (652 nm). After 24 h post-irradiation, cell viability was estimated with MTT test. As shown in **figure 4**, the nanoparticles induced a light dose-dependent increase in photocytotoxicity, achieving at 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  a

decrease in cell viability up to 24 and 1% for 0.1 and 1.0  $\mu\text{M}$  TPC, respectively. Moreover, the nanoparticles exhibited photocytotoxicity in a TPC concentration-dependent manner as the nanoparticles at 1.0  $\mu\text{M}$  was 3.3 times more effective than 0.1  $\mu\text{M}$  (50% cell growth inhibitory light dose,  $\text{DL}_{50} = 9.16$  vs. 2.80  $\text{J}/\text{cm}^2$  at 0.1 and 1.0  $\mu\text{M}$ , respectively).

The dynamic response of the MDA-MB-231 cancer cells exposed to increasing concentrations of NP-TPC-ATWLPPR and various doses of light was also monitored using real-time impedance-based analysis (**Fig. 5A-B-C**). As expected according to our findings from dark cytotoxicity kinetics (**Fig. 3B**), no decrease in cell index values was observed during the first 24 h post-exposure to nanoparticles before light irradiation (**Fig. 5, left panel**). However, cell index kinetics obtained during the time interval from 25 to 55 h post-irradiation clearly showed discriminant profiles (**Fig. 5A-B-C, right panel**). According to nanoparticles concentrations and light doses, kinetic profiles showed a transient or a persistent decrease of normalized cell index (**Fig. 5A-B-C, right panel**). Beside the nanoparticles concentration- and the light dose-dependent photocytotoxicity, distinct phases of cell response along the post-irradiation period can be highlighted, thus showing time-dependent cellular effect. Interestingly, as shown on **Fig. 5-D (right panel)**, photosensitizer-free nanoparticles (NP) showed no decrease of cell index values whatever the concentrations even after light irradiation with 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  as compared to untreated cells. This means that the nanoparticles-induced photocytotoxicity relies on the photoactivation of the photosensitizer molecules grafted inside the nanoparticles.



**Figure 4.** In vitro photodynamic activity of nanoparticles-containing photosensitizer and peptide (NP-TPC-ATWLPPR) according to MTT assay. MDA-MB-231 cells were exposed to 0.1  $\mu\text{M}$  (black) and 1.0  $\mu\text{M}$  (gray) of TPC in NP-TPC-ATWLPPR. Following a 24 h-incubation at 37°C, cells were washed and exposed to the indicated doses of light and incubated for further 24 h. Cell viability was then measured using MTT assay. Values are the average of six replicates and presented as the mean  $\pm$  SD.  $\text{DL}_{50} = 9.2$  or 2.8  $\text{J}/\text{cm}^2$  at 0.1 and 1  $\mu\text{M}$  of TPC in NP-TPC-ATWLPPR, respectively.

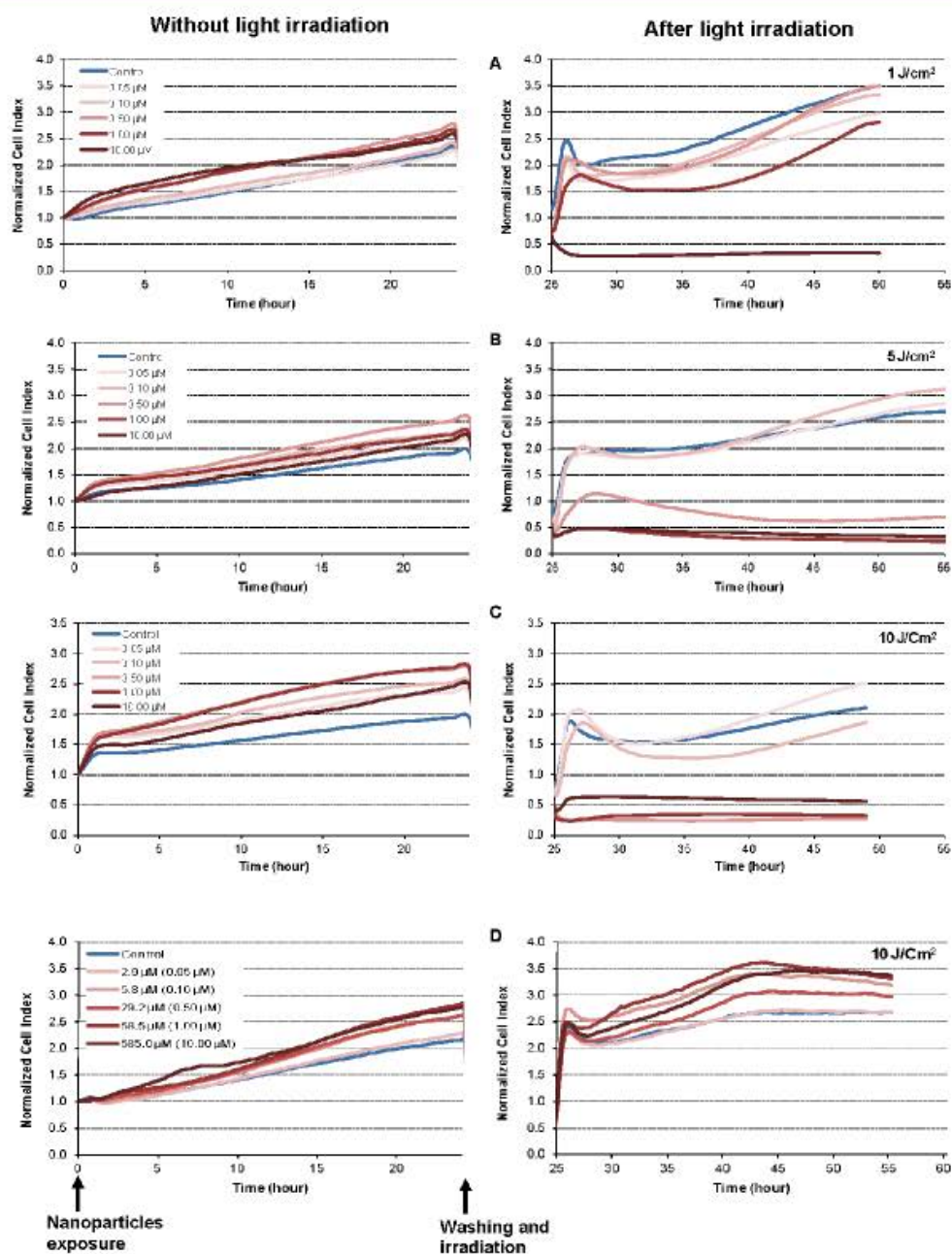


Figure 5. Kinetics of photo-induced cytotoxicity of nanoparticles according to real-time impedance-based analysis. MDA-MB-231 cells were monitored for 24 h during interaction with NP-TPC-ATWLPPR (A, B, C) or NP (D) at the indicated concentrations of photosensitizer or the corresponding concentration of gadolinium oxide for the control NP (left panel). Following washing, cells were exposed to various light doses (A: 1 J/cm<sup>2</sup>, B: 5 J/cm<sup>2</sup>, C and D: 10 J/cm<sup>2</sup>) (right panel). Presented cell index values are the mean of 6 replicates.

### Tumor tissue selectivity and MRI contrast enhancement in vivo

To investigate MRI contrast enhancement in tumor tissue, cerebral MRI analysis of *nude* rats with orthotopic U87 glioblastoma model was performed about 20 days after intracranial tumor implantation. MRI analysis of the tumor tissue was investigated for intravenously injected un-conjugated and peptide-targeted gadolinium-based hybrid nanoparticles. Dynamic data of MRI signal intensity from the selected regions of interest (ROIs) in the tumor and the contralateral tissue were expressed as the mean signal per area unit and used to create kinetics of MRI contrast enhancement (EHC %) for all time points post-injection. The kinetics represent MRI contrast

enhancement in both tumor and contralateral tissue normalized to the pre-injection MRI signal, and MRI contrast enhancement in tumor tissue normalized to contralateral tissue (Fig. 6A-B). As shown in Fig. 6A-B, immediately after intravenous injection, whatever the nanoparticles types the MRI contrast enhancement increased rapidly and specifically in tumor ROIs to achieve maximum enhancement at 2-7 min post-injection, reflecting nanoparticles incorporation in tumor. We can note that tumor MRI signal intensity appears to be higher in rats injected with non-targeted nanoparticles probably due to higher pre-injection MRI signal (2.5-fold) because of more extended tumor mass as compared to that injected with targeted nanoparticles (Fig. 6B-C).

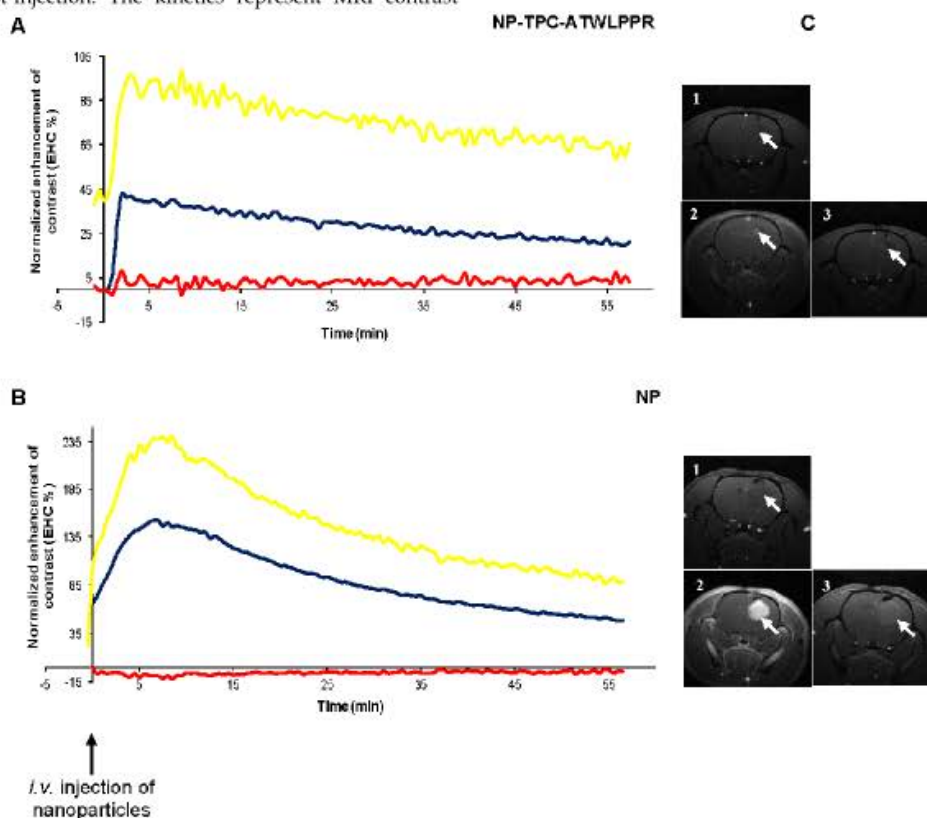


Figure 6. Cerebral biodistribution and tumor MRI contrast enhancement by gadolinium-based hybrid silica nanoparticles with or without targeting peptide monitored during 1h and, immediately after intravenous injection. Dynamic T1-weighted images acquisition was started before intravenous injection of the nanoparticles (25  $\mu$ mol of Gd / 250 g of body weight) to characterize the kinetics of the nanoparticles biodistribution in the tumor. MRI signal intensity kinetics of injected peptide-conjugated NP-TPC-ATWLPPR (A), and un-conjugated NP (B) nanoparticles were expressed as the enhancement of contrast (EHC %) normalized on pre-injection signal. The curves represent time-dependent signal intensity recorded from different ROIs selected from: ■ Contralateral healthy hemisphere, ■ Tumor tissue, or ■ the EHC in the tumor tissue as normalized on the contralateral healthy hemisphere. C) T1 coronal MRI images obtained (1) before nanoparticles injection, (2) maximal MRI signal intensity after injection and (3) 1h post-injection.



Most interestingly however, distinct decrease rates of tumor MRI contrast kinetics from the maximum peak were observed according to nanoparticles type. Indeed, peptide-targeted nanoparticles showed slower time-dependent decrease (2.75-fold) of tumor MRI contrast as compared to non-targeted NP ( $-0.0072$  vs.  $-0.0198 \text{ min}^{-1}$ ). Using the semi-logarithmic presentation of MRI contrast enhancement decrease kinetics (data not shown), half-life of peptide-targeted nanoparticles in the tumor tissue was estimated to be 2.75-fold than that of the non-targeted nanoparticles

( $T_{1/2} = 96.25$  vs.  $35.00$  min). To evaluate *in vivo* biodistribution of the nanoparticles  $\sim 75$  min post-intravenous injection, tumor-bearing rats were sacrificed at the end of MRI analysis and organs were subjected to gadolinium content quantification. Post-mortem ICP-MS analysis of the organs/tissues showed that whatever the nanoparticles groups gadolinium was detected in liver at low levels, but essentially present in kidneys and urine (Fig. 7), suggesting rapid clearance of the nanoparticles by the renal route.

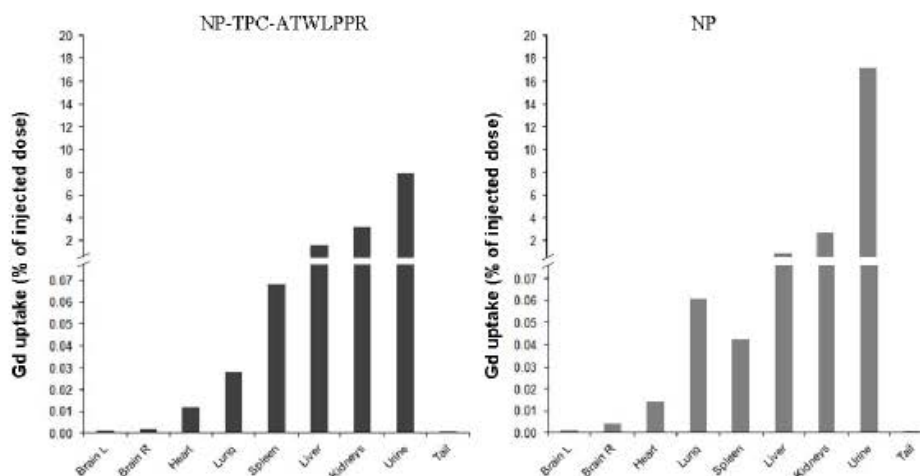


Figure 7. Biodistribution of gadolinium-based hybrid silica nanoparticles with or without targeting peptide at 1h15 after intravenous injection (25  $\mu\text{mol}$  of Gd/  $\sim 250$  g of body weight) in the caudal vein with NP-TPC-ATWLPPR (A) or NP (B). Gadolinium uptake was determined by ICP-MS analysis and expressed as percentage of the injected dose. Brain L: left brain hemisphere, Brain R: right brain hemisphere bearing xenografted tumor.

## Discussion

Our strategy aims to favor the vascular effect of PDT by targeting tumor-associated vascularisation using peptide-functionalized theranostic nanoparticles. The present study describes the development and the evaluation of novel small multifunctional silica-based nanoparticles as potential theranostic system for an integrated vascular-targeted PDT and MRI. Previous works of our group described the conjugation of chlorin photosensitizer to ATWLPPR peptide targeting NRP-1 over-expressed in tumor angiogenic vessels. In the present work, we developed ATWLPPR-targeted silica-based nanoparticles with gadolinium chelates as MRI contrast agent and a chlorin as photosensitizer. The nanoparticles were surface-functionalized with hydrophilic DOTAGA in part as scaffold for grafting of ATWLPPR peptide units. *In vitro* studies demonstrated the photodynamic

efficiency of the chlorine-doped multifunctional nanoparticles on cancer cells and their ability to target NRP-1 protein through the targeting peptide moiety.

Multifunctional nanoparticles demonstrated *in vitro* photodynamic efficiency related to photosensitizer concentration and light dose as showed by using both impedance-based real-time cell analysis and MTT assay. In the absence of light irradiation, our multifunctional nanoparticles displayed no cytotoxicity at low concentrations, except a delayed alteration of cell proliferation observed with the cell index kinetics. Such late effect may be due to long retention of nanoparticles in *in vitro* cell culture system. Indeed, we observed alterations in cell proliferation even for low concentrations of nanoparticles however MTT test only showed a cytotoxic effect with the highest test concentration of  $10 \mu\text{M}$ . This discrepancy already reported in the literature, may be mainly due to the fact that both assays measure distinct cell activities;

MTT test detects cell viability through mitochondrial metabolism, while RTCA considers cell death or proliferation, cell morphology, and cell adhesion to the well as defined by cells-microelectrode contact surface [42, 45-48]. This observation raises the question about the underlying mechanism of nanoparticles interaction on cellular activities. Numerous research groups have pointed out the difficulty of using classical single-point techniques usually based on cell metabolism activity to assess nanoparticles-related cytotoxicity [49, 50]. Multifunctional nanoparticles conferred photosensitivity to cancer cells, providing evidence that the photosensitizer molecules covalently grafted within the nanoparticle matrix can be photoactivated *in vitro*. As reported by our group [34], such nanoparticles indeed did not alter the photophysical properties of the encapsulated chlorin photosensitizer. Their photodynamic activity resulted in the loss of cell activities related to photosensitizer concentration and light dose since no photocytotoxicity was detected with control nanoparticles without photosensitizer. Accordingly, nanoparticles-encapsulated photosensitizer molecules inducing photosensitivity to cells were largely reported. Kopelman *et al.* synthesized a polyacrylamide multifunctional platform containing a MRI contrast enhancement agent and Photofrin® photosensitizer, as well as targeting unit (the integrin-targeting RGD peptide) for specific cell targeting [25, 51, 52]. *In vitro* studies confirmed the photoactivation of the encapsulated photosensitizer generating efficient PDT activity on cancer cells. More recently, Zhao *et al.*, described the synthesis of silica-coated lanthanide-doped nanoparticles with phthalocyanine (AIC4Pc) photosensitizer covalently incorporated inside the silica shell for PDT and MRI. The authors demonstrated the ability of the nanoparticles to kill cancer cell upon near-infrared irradiation without cytotoxicity in darkness [27].

Molecular affinity was investigated for peptide-functionalized nanoparticles, demonstrating the ability of ATWLPPR homing peptide to bind recombinant NRP-1 protein. Peptide-conjugated chlorin demonstrated a molecular affinity of 213  $\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$  value, the concentration of competitor that displaced 50% of VEGF<sub>165</sub> binding) [38]. ATWLPPR-targeted nanoparticles (~3 peptides per nanoparticle) showed a 3.5-fold high molecular recognition for NRP-1 protein ( $\text{EC}_{50}$  = 56.6  $\mu\text{M}$ ). This may be explained by a positive cooperativity in binding of nanoparticle-grafted ATWLPPR units through multivalent interactions with NRP-1 protein. Moreover, it is noticeable that previous findings of our group have still showed no additional increase of affinity with more than four peptides per nanoparticles [34] probably because ste-

ric hindrance due to the number of peptide units.

Real-time monitoring of *in vivo* MRI signal allowed us to demonstrate that intravenously injected nanoparticles induced specific enhancement of MRI contrast in tumor tissue, reflecting their high tumortropic accumulation. This reveals the potential of the nanoparticles as MRI contrast enhancer and suggests nanoparticles passive targeting of tumor tissue probably through the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect characterizing malignant tissues [53, 54]. Leaky vessels with large fenestrations result in extravasation and extensive leakage of circulating nanoparticles into the tumor tissue [17]. Slow venous return in tumor tissue and the poor lymphatic clearance cause intratumoral retention of nanoparticles. Furthermore, both types of nanoparticles are surface-functionalized with hydrophilic DOTAGA chelates that could endow the nanoparticles with water dispersibility and bioavailability [55] and improve their relaxivity properties [56, 55, 33]. Lux and co-workers (2011) have recently reported that similar small gadolinium hybrid nanoparticles functionalized with DOTA displayed significant increase of longitudinal relaxivities in solution with better MRI contrast enhancement *in vivo* as compared to DOTA(Gd) or DOTAREM®, among the most frequently used MRI contrast agents [33]. It should be noted that tumor MRI signal intensity appears to be higher with non-targeted nanoparticles probably due to the more extended tumor mass. Interestingly, we evidenced that ATWLPPR-targeted nanoparticles can favour the intratumoral retention of functionalized nanoparticles compared to control nanoparticles, providing a prolonged selective and positive MRI contrast enhancement. This could indicate that tumor clearance of peptide-targeted nanoparticles is delayed through peptide functionalization. Although the use of targeted nanoparticles as platforms for theranostic applications have been widely described, it is the first time that multifunctional silica-based nanoparticles targeting NRP-1 have been evaluated *in vivo* as a delivery system for PDT and imaging agents.

In this targeting strategy, we revealed the *in vitro* photodynamic efficiency of the multifunctional silica-based nanoparticles for PDT and their accumulation in tumor tissues. Our findings are promising and warrant further studies using these multifunctional nanoparticles for cancer theranostics *in vivo*.

## Abbreviations

APTES: AminoPropylTriEthoxySilane; ATCC: American Type Culture Collection; ATWLPPR: H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH; Boc: *Tert*-butoxy carbonyl; BSA: Bovine Serum Albumine; CI: Cell



Index; DEG: diethylene glycol; DIEA: N,N-Diisopropylethylamine; DMF: Dimethylformamide; DMSO: Dimethyl sulfoxide; DOTAGA: (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4,7,10-triacetic) acid; EDC: Ethylene DiChloride; EHC: Enhancement of Contrast; FBS: Fetal Bovine Serum; Fmoc: 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl; HBSS: Hank's Buffered Salt Solution; HBTU: 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate; ICP-MS: Inductively coupled plasma-mass spectrometry; MRI: Magnetic Resonance Imaging; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NP: Nanoparticle; NRP-1: Neupilin-1 receptor; <sup>1</sup>O<sub>2</sub>: singlet oxygen; Pbf: 2,2,4,6,7-pentamethylidihydro-benzofuran-5-sulfonyl; PBS: Phosphate Buffered Saline; PCS: Photon Correlation Spectroscopy; PDT: photodynamic therapy; ROS: Reactive Oxygen Species; RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium; RTCA SP: Real Time Cell Analyzer Single Plate; tBu: *tertio*-butyl; TEA: TriEthylAmine; TFA: trifluoroacetic acid; TEOS: TriEthOxy Silane; TPC: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin; TPC-NHS: 5,10,15,tri-(p-tolyl)-20-(p-carboxylphenyl)chlorinsuccinidyl ester; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

### Acknowledgment

This work was supported by the research funds of the French Ligue Nationale Contre le Cancer and the French ANR (Agence Nationale de la Recherche) project no. 08-PCV1-0021-01-entitled "NanoVIP". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

### References

- Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 1976; 36: 2326-9.
- Fingar VH. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 1996; 14:323-8.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 889-905.
- Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem Soc Rev.* 1995; 24: 19-33.
- McCaughan JS Jr. Photodynamic therapy: a review. *Drugs Aging.* 1999; 15: 49-68.
- Del Governatore M, Hamblin MR, Shea CR, Rizvi I, Molpus KG, Tanabe KK et al. Experimental photoimmunotherapy of hepatic metastases of colorectal cancer with a 17.1A chlorin(e6) immunoconjugate. *Cancer Res.* 2000; 60: 4200-5.
- Chaloin L, Bigey P, Loup C, Marin M, Galeotti N, Piechaczyk M et al. Improvement of porphyrin cellular delivery and activity by conjugation to a carrier peptide. *Bioconjug Chem.* 2001; 12: 691-700.
- Sharman WM, van Lier JE, Allen CM. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56: 53-76.
- Tang W, Xu H, Kopelman R, Philbert MA. Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms. *Photochem Photobiol.* 2005; 81: 242-9.
- Konan YN, Berton M, Gurny R, Allemann E. Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. *Eur J Pharm Sci.* 2003; 18: 241-9.
- Qin M, Hah HJ, Kim G, Nie G, Lee YE, Kopelman R. Methylene blue covalently loaded polyacrylamide nanoparticles for enhanced tumor-targeted photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2011; 10: 832-41.
- Tozer GM, Bicknell R. Therapeutic targeting of the tumor vasculature. *Semin Radiat Oncol.* 2004; 14: 222-32.
- Chen B, Pogue BW, Lura JM, Hardman RL, Hoopes PJ, Hasan T. Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: effects, mechanism, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 917-23.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995; 1: 27-31.
- Ichikawa K, Hikiita T, Maeda N, Yonezawa S, Takeuchi Y, Asai T et al. Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1669: 69-74.
- Fingar VH, Taber SW, Haydon PS, Harrison LT, Kempf SJ, Wieman TJ. Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville. *In Vivo.* 2000; 14: 93-100.
- Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today.* 2006; 11: 812-8.
- Starzec A, Ladam P, Vassy R, Badache S, Bouchemal N, Navaza A et al. Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPFR peptide inhibiting VEGF(165) binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPFR/neuropilin-1 complex. *Peptides.* 2007; 28: 2397-402.
- Tirand L, Frochet C, Vanderesse R, Thomas N, Trinquet E, Pinel S et al. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release.* 2006; 111: 153-64.
- Thomas N, Bechet D, Becuwe P, Tirand L, Vanderesse R, Frochet C et al. Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 96: 101-8.
- Thomas N, Tirand L, Chatelut E, Plénat F, Frochet C, Dodelier M et al. Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPFR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. *Photochem Photobiol Sci.* 2008; 7: 433-41.
- Bechet D, Tirand L, Faivre B, Plénat F, Bonnet C, Bastogne T et al. Neuropilin-1 targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release. *Pharm Res.* 2010; 27: 468-79.
- Tirand L, Thomas N, Dodelier M, Dumas D, Frochet C, Maunit B et al. Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35: 806-13.
- Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60: 1627-37.
- Kopelmana R, Koo YEL, Philbert M, Moffat BA, Reddy GR, McConville P et al. Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2005; 293: 404-10.
- Reddy GR, Bhejani MS, McConville P, Moody J, Moffat BA, Hall DE et al. Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 6677-86.
- Zhao Z, Han Y, Lin C, Hu D, Wang F, Chen X et al. Multifunctional core-shell upconverting nanoparticles for imaging and photodynamic therapy of liver cancer cells. *Chem Asian J.* 2012; 7: 830-7.
- Lee SJ, Park K, Oh YK, Kwon SH, Her S, Kim IS et al. Tumor specificity and therapeutic efficacy of photosensitizer-encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor-bearing mice. *Biomaterials.* 2009; 30: 2929-39.
- Bechet D, Couleaud P, Frochet C, Viriot ML, Guillemain F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.* 2008; 26: 612-21.

30. Brevet D, Gary-Bobo M, Raehm L, Richeter S, Hocine O, Amro K, Looock B et al. Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Chem Commun (Camb)*. 2009; (12): 1475-7.
31. Bridot JL, Faure AC, Laurent S, Rivière C, Billotey C, Hiba B et al. Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: multimodal contrast agents for in vivo imaging. *J Am Chem Soc*. 2007; 129: 5076-84.
32. Faure AC, Dufort S, Jossierand V, Perriat P, Coll JL, Roux S et al. Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small*. 2009; 5: 2565-75.
33. Lux F, Mignot A, Mowat P, Louis C, Dufort S, Bernhard C et al. Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011; 50: 12299-303.
34. Couleaud P, Bechet D, Vanderesse R, Barberi-Heyob M, Faure AC, Roux S et al. Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2011; 6: 995-1009.
35. Bazzi R, Flores-Gonzalez MA, Louis C, Lebbou K, Dujardin C, Brenier A, et al. Synthesis and unimescent properties of sub-5-nm lanthanide oxides nanoparticles. *Journal of Luminescence*. 2003; 102: 445-50.
36. Bazzi R, Flores MA, Louis C, Lebbou K, Zhang W, Dujardin C et al. Synthesis and properties of europium-based phosphors on the nanometer scale: Eu<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu, and Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu. *J Colloid Interface Sci*. 2004; 273: 191-7.
37. Louis C, Bazzi R, Marquette CA, Bridot JL, Roux S, Ledoux G et al. Nanosized hybrid particles with double luminescence for biological labelling. *Chem Mater*. 2005; 17: 1673-82.
38. Thomas N, Pernet M, Vanderesse R, Becuwe P, Kamaralzaman E, Da Silva D et al. Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80: 226-35.
39. Whitlock Jr HW, Hanauer R, Oester MY, Bower BK. Dimid reduction of porphyrins. *J Am Chem Soc*. 1969; 91: 7485-9.
40. Di Stasio B, Frochot C, Dumas D, Even P, Zwier J, Müller A et al. The 2-aminoglucoamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur J Med Chem*. 2005; 40: 1111-22.
41. Tanford C. *Physical Chemistry of Macromolecules*. John Wiley and Sons: New York, 1961.
42. Kirstein SL, Atienza JM, Xi B, Zhu J, Yu N, Wang X et al. Live cell quality control and utility of real-time cell electronic sensing for assay development. *Assay Drug Dev Technol*. 2006; 4: 545-53.
43. Urcan E, Haertel U, Stylou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater*. 2010; 26: 51-8.
44. Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, Guillemin F et al. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem*. 2005; 13: 2799-808.
45. Quereda JJ, Martínez-Alarcón L, Mendoga L, Maijado MJ, Herretero-Medrano JM, Pallarés FJ et al. Validation of xCELLigence real-time cell analyzer to assess compatibility in xenotransplantation with pig-to-baboon model. *Transplant Proc*. 2010; 42: 3239-43.
46. Heng BC, Das GK, Zhao X, Ma LL, Tan TT, Ng KW et al. Comparative cytotoxicity evaluation of lanthanide nanomaterials on mouse and human cell lines with metabolic and DNA-quantification assays. *Biointerphases*. 2010; 5: FA88-97.
47. Soenen SJ, De Cuyper M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol Imaging*. 2009; 4: 207-19.
48. Hanusová V, Králová V, Schröterová L, Trilečková L, Pakostová A, Skálová L. The effectiveness of oracin in enhancing the cytotoxicity of doxorubicin through the inhibition of doxorubicin deactivation in breast cancer MCF7 cells. *Xenobiotica*. 2010; 40: 681-90.
49. Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro JM, Parak WJ, De Smedt SC, Kevin Braeckmans. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today*. 2011; 6: 446-65.
50. Mariani V, Ponti J, Giudetti G, Broggi F, Marmorato P, Gioria S et al. Online monitoring of cell metabolism to assess the toxicity of nanoparticles: the case of cobalt ferrite. *Nanotoxicology*. 2012; 6: 272-87.
51. Ross B, Rehemtulla A, Koo YEL, Reddy R, Kim C, Behrend C et al. Photonic and Magnetic Nanoexplorers for Biomedical Use: From Sub-cellular Imaging to Cancer Diagnostics and Therapy. *Proc SPIE-Int Soc Optical Eng*. 2004; 76-83.
52. Koo YE, Fan W, Hah H, Xu H, Orringer D, Ross B et al. Photonic explorers based on multifunctional nanoplateforms for biosensing and photodynamic therapy. *Appl Opt*. 2007; 46: 1924-30.
53. Khemtong C, Kessinger CW, Gao J. Polymeric nanomedicine for cancer MR imaging and drug delivery. *Chem Commun (Camb)*. 2009; (24): 3497-510.
54. Barreto JA, O'Malley W, Kubeil M, Graham B, Stephan H, Spiccia L. Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy. *Adv Mater*. 2011; 23: H18-40.
55. Liu T, Li X, Qian Y, Hu X, Liu S. Multifunctional pH-disintegrable micellar nanoparticles of asymmetrically functionalized  $\beta$ -cyclodextrin-based star copolymer covalently conjugated with doxorubicin and DOTA-Gd moieties. *Biomaterials*. 2012; 33: 2521-31.
56. Ratzinger G, Agrawal P, Körner W, Lonkaj J, Sanders HM, Terreno E et al. Surface modification of PLGA nanospheres with Gd-DTPA and Gd-DOTA for high-relaxivity MRI contrast agents. *Biomaterials*. 2010; 31: 8716-23.



La suite de cette étude a consisté en la comparaison du lot 5 et du lot 13 du plan d'expérience, respectivement **PC DOTA 2Si TPC 0,1 L5** et **PC DOTA 4 Si TPC 0** qui ont été choisis pour les similitudes qu'ils présentent au niveau de leurs compositions. Dans cette étude, Benachour et al. (2012) ont analysé les données dynamiques, obtenues à partir du système RTCA mentionné précédemment, concernant les effets cytotoxiques et photocytotoxiques de ces nanoparticules multifonctionnelles sur des cellules cancéreuses du sein (MDA-MB-231). Le système RTCA est basé sur les mesures de variation d'impédance en temps réel, en fonction du développement cellulaire observé. Le signal d'impédance est converti automatiquement en une valeur nommée « indice cellulaire » (CI pour *Cell Index*) qui indique la variation relative d'impédance électrique créée par les cellules fixées à l'électrode de mesure (*cellular status*). Cette valeur est liée de façon proportionnelle aux différentes variables que sont : le nombre de cellules cultivées, leur vitesse de prolifération et de croissance, leur capacité d'adhésion sur l'électrode et leur morphologie. L'analyse de l'impédance cellulaire permet d'appréhender plusieurs paramètres biologiques simultanément permettant d'obtenir une vision globale de la prolifération cellulaire et de la dynamique de croissance au cours du temps. L'analyse dynamique des effets photocytotoxiques induits par les deux lots de nanoparticules (lot 5 et lot 13) montrent de profils de réponse cellulaire dont la cinétique est reliée à la concentration en chlorure et à la dose lumière.

La première phase de cette étude a consisté à tester la cytotoxicité à l'obscurité du lot 5 (NP-PS) et du lot 13 (NP) par un test MTT pour des concentrations allant respectivement de 0,05 à 10  $\mu\text{M}$  en chlorure et de 2,9 à 585  $\mu\text{M}$  en gadolinium. Les fortes concentrations en PS et en Gd (10  $\mu\text{M}$ / 585  $\mu\text{M}$ ) ont montré une réduction de la survie cellulaire pour les NP-PS et les NP (respectivement 37% et 41% par rapport aux cellules témoins) mais, aucun effet cytotoxique n'a été mesuré pour les cellules exposées à des concentrations de NP et de NP-PS allant de 0,05  $\mu\text{M}$  à 1,00  $\mu\text{M}$  (survie supérieure à 80% par rapport aux cellules témoins). En pratique, la réponse cellulaire a été suivie à l'obscurité pendant 143 heures après la mise en contact des cellules avec les nanoparticules. Les mesures effectuées ont montré une diminution du CI 24 heures après l'addition des nanoparticules (NP et NP-PS) qui correspond à l'étape de lavage des cellules permettant d'éliminer les nanoparticules qui n'ont pas été internalisées après cette période d'incubation. Cependant, après un délai de 60 heures d'exposition des cellules avec les nanoparticules, la valeur du CI montre une diminution en fonction du temps, par rapport aux cellules témoins, et ceci pour toutes les concentrations testées. Les résultats obtenus ont ensuite été étudiés mathématiquement par une analyse de variance à variables multiples (ANOVA pour *multivariate analysis of variance*) associée à une analyse canonique des valeurs normalisées de l'indice cellulaire (NCI pour *normalized cell index*) dans le but d'identifier les périodes de temps (de 0 à 143 heures) qui présentent des informations intéressantes, c'est-à-dire pour lesquelles il existe une différence statistiquement significative des valeurs de NCI entre les six concentrations. Les analyses des résultats entre les périodes allant de 25 à 120 heures regroupent 95% des informations contenues dans les données brutes. L'analyse canonique de ces données a permis de mettre en évidence deux groupes bien distincts nommés G1 et G2 qui correspondent respectivement aux périodes expérimentales à 45 heures et à 120 heures. A ces deux groupes ont été associés deux temps notés T1 (pour G1) et T2 (pour G2). Le temps T1 = 45 h ne montre pas de variation significative entre les six concentrations différentes de NP et de NP-PS. Cependant, le temps T2 = 120 h révèle une diminution statistiquement significative des valeurs de l'NCI en fonction de la concentration, indiquant une altération de la prolifération des cellules par les nanoparticules.

La deuxième phase a consisté en l'étude de la phototoxicité de ces deux lots de nanoparticules. Ceci a été également obtenu par l'analyse en temps réel du signal d'impédance des cellules MBA-MB-231 exposées aux NP-PS avec des doses variables de lumière. L'analyse des données obtenues durant l'intervalle de temps de 25 à 55 heures avec des doses-lumières variables (1, 5, 10  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) a mis en évidence modification des profils des CI. Une diminution des NCI suivit d'une augmentation de ces

valeurs a été observé pour les faibles concentrations de NP-PS et/ou les faibles doses de lumière. A l'opposé, les fortes concentrations et/ou les fortes doses-lumières montrent uniquement une diminution des valeurs du NCI. Un test WST-1 a permis de confirmer les résultats obtenus par le test XCELLigence. Les données obtenues lors des manipulations ont ensuite été analysées par un modèle paramétrique afin d'évaluer globalement la réponse cellulaire. Pour cela, les variables CI ont été transformées en un nouveau modèle de variables appelé « indice cellulaire transformé » (TCI pour *transformed cell index*) qui permet d'avoir un profil quasi-linéaire des variables CI. Les TCI sont décrits par un modèle représenté par une courbe d'équation exponentielle-linéaire à trois paramètres ( $r$  : l'état de croissance cellulaire quasi stationnaire,  $T$  : le constante de temps et  $K$  : la constante de magnitude de décroissance des TCI). Ces paramètres, liés à la concentration ( $C$ ) en nanoparticules et au flux lumineux, caractérisent la réponse cellulaire photo-induite. La courbe obtenue est constituée de deux parties, l'une est exponentielle et correspond à la phase décroissante de la réponse cellulaire et l'autre, linéaire, correspond à un état quasi-stationnaire de la réponse cellulaire. Un effet photodynamique important est caractérisé par un paramètre  $K$  élevé et des valeurs de  $T$  et de  $r$  faibles, ce qui suggère de fortes interactions entre ces trois paramètres photodynamiques et leur capacité à caractériser la réponse cellulaire *in vitro* suite à l'irradiation des nanoparticules.

Ces résultats ont ainsi permis de démontrer qu'en combinant les valeurs expérimentales à un modèle mathématique, il est possible d'obtenir une évaluation rapide, complète et précise de la réponse cellulaire ce qui permet d'orienter et de caractériser l'effet biologique des nanoparticules *in vitro*.

L'Afsset (Bulletin de veille scientifique en sécurité sanitaire de l'environnement et du travail - Juin 2010) pointe l'importance d'effectuer une caractérisation rigoureuse des nanoparticules *in vitro* préalablement à leur étude toxicologique *in vivo*. Nous savons que la taille, la surface spécifique et la charge en surface sont autant d'éléments qui influencent à la fois la distribution des nanoparticules dans l'organisme et leur cytotoxicité, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cela implique qu'une attention particulière doit être portée au contrôle des propriétés des nanoparticules lors du développement de nanomatériaux, notamment pour un usage thérapeutique ou diagnostique. A titre d'exemple, les nanoparticules de silice synthétiques sont de plus en plus utilisées pour le diagnostic et la recherche médicale. La majorité des études *in vitro* a mis en évidence une forte agglomération dans les milieux d'exposition, notamment en présence de sérum. La taille des agglomérats de nanoparticules de dioxyde de silicium par exemple dépasse alors l'échelle nanométrique. Notre approche expérimentale publiée ci-dessous a permis de tester la cytotoxicité de nos nanoparticules par différentes approches complémentaires *in vitro*. Nos résultats obtenus par test classique MTT (activité mitochondriale), indiquent que les nanoparticules en polysiloxane testées provoquent des dommages cellulaires caractérisés par une diminution de la viabilité cellulaire dose-dépendante. D'après les résultats obtenus par ce test, les doses de 0,05 et 0,1  $\mu\text{M}$  n'affectent pas la viabilité cellulaire. Cependant, ces faibles concentrations affectent pourtant la prolifération des cellules mesurée par le suivi d'impédance en temps réel. Les tests métaboliques usuels ne sont donc pas complètement satisfaisants et ne rendent pas compte des effets cytotoxiques induits par un contact avec des faibles doses de nanoparticules. En effet, des altérations peuvent inclure une perte d'adhérence, des modifications morphologiques et des dommages membranaires. Les nanoparticules interfèrent avec les tests métaboliques classiques, seule l'utilisation de plusieurs tests complémentaires aux conclusions convergentes peut attester de la fiabilité des résultats.

# Real-Time Monitoring of Photocytotoxicity in Nanoparticles-Based Photodynamic Therapy: A Model-Based Approach

Hamanou Benachour<sup>1,2</sup>, Thierry Bastogne<sup>1,2,3</sup>, Magali Toussaint<sup>1,2</sup>, Yosra Chemli<sup>1,2</sup>, Aymeric Sève<sup>4</sup>, Céline Frochot<sup>4,5</sup>, François Lux<sup>6,7</sup>, Olivier Tillement<sup>6,7</sup>, Régis Vanderesse<sup>8,9</sup>, Muriel Barberi-Heyob<sup>1,2,5,10\*</sup>

**1** Université de Lorraine, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, France, **2** CNRS, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, France, **3** Inria, Biologie, Génétique et Statistiques (BIGS), UMR 7502, Institut Elie Cartan Nancy (IECN), Vandœuvre-lès-Nancy, France, **4** CNRS, Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UPR 3349, Nancy, France, **5** CNRS, GdR 3049 "Médicaments Photoactifs - Photochimiothérapie (PHOTOMED)", France, **6** Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents (LPCML), UMR 5620, Villeurbanne, Lyon, France, **7** CNRS, Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents (LPCML), UMR 5620, Villeurbanne, Lyon, France, **8** Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR 7568, Nancy, France, **9** CNRS, Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR 7568, Nancy, France, **10** Centre Alexis Vautrin, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer (CRLCC), Vandœuvre-lès-Nancy, France

## Abstract

Nanoparticles are widely suggested as targeted drug-delivery systems. In photodynamic therapy (PDT), the use of multifunctional nanoparticles as photoactivatable drug carriers is a promising approach for improving treatment efficiency and selectivity. However, the conventional cytotoxicity assays are not well adapted to characterize nanoparticles cytotoxic effects and to discriminate early and late cell responses. In this work, we evaluated a real-time label-free cell analysis system as a tool to investigate in vitro cyto- and photocytotoxicity of nanoparticles-based photosensitizers compared with classical metabolic assays. To do so, we introduced a dynamic approach based on real-time cell impedance monitoring and a mathematical model-based analysis to characterize the measured dynamic cell response. Analysis of real-time cell responses requires indeed new modeling approaches able to describe suited use of dynamic models. In a first step, a multivariate analysis of variance associated with a canonical analysis of the obtained normalized cell index (NCI) values allowed us to identify different relevant time periods following nanoparticles exposure. After light irradiation, we evidenced discriminant profiles of cell index (CI) kinetics in a concentration- and light dose-dependent manner. In a second step, we proposed a full factorial design of experiments associated with a mixed effect kinetic model of the CI time responses. The estimated model parameters led to a new characterization of the dynamic cell responses such as the magnitude and the time constant of the transient phase in response to the photo-induced dynamic effects. These parameters allowed us to characterize totally the in vitro photodynamic response according to nanoparticle-grafted photosensitizer concentration and light dose. They also let us estimate the strength of the synergic photodynamic effect. This dynamic approach based on statistical modeling furnishes new insights for in vitro characterization of nanoparticles-mediated effects on cell proliferation with or without light irradiation.

Citation: Benachour H, Bastogne T, Toussaint M, Chemli Y, Sève A, et al. (2012) Real-Time Monitoring of Photocytotoxicity in Nanoparticles-Based Photodynamic Therapy: A Model-Based Approach. *PLoS ONE* 7(11): e48617. doi:10.1371/journal.pone.0048617

Editor: Inna Agoulnik, Florida International University, United States of America

Received June 10, 2012; Accepted September 27, 2012; Published November 7, 2012

Copyright: © 2012 Benachour et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the research funds of the French Ligue Nationale Contre le Cancer and the Agence Nationale de la Recherche project no. 08-PCV1-0021-01-entitled "NanoVTP". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: m.barberi@nancy.unicancer.fr

## Introduction

Drug delivery systems able to selectively target diseased tissues with minimum side effects remain a major challenge in the development of efficient pharmacological treatments for cancer. Currently, one exciting approach towards the development of suitable delivery systems, that can circumvent the physiological barriers and mechanisms that may compromise efficiency of the treatment, involves the use of nanocarrier systems tailored to selectively deliver active molecules to target tissues [1–3]. Numerous nanosized objects have been explored in many biomedical applications because of their novel properties, such as their high surface to volume ratio, their surface tailorability and

their multifunctionality [4,5]. As drug carriers, nanoparticle systems consist of different composition types and molecular structures within the active molecules can be entrapped or conjugated covalently. Accumulating investigations have demonstrated the potential of nanoparticles in clinical applications, and especially in the development of anticancer therapies [1,6,7]. Recent researches in imaging and diagnostic applications of nanoparticles have also clearly illustrated the direct impact of such nanomaterials on the possibility to investigate the biodistribution and pharmacokinetic of nanoparticles-based drug carrier systems, both in vitro and in vivo. Some of the recent researches using nanoparticles as magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents, fluorescence imaging agents, and potential carriers for drug

delivery, have been published [8–12]. In this field, our group described multifunctional fluorescent nanoparticles containing a gadolinium oxide core as very attractive system, aiming at combining both imaging (fluorescence, MRI) and therapy (X-ray therapy, photodynamic therapy (PDT)) techniques [13,14].

PDT for cancer involves the uptake of a photoactivatable drug, also known as photosensitizer or photosensitizing agent, by cancer tissue followed by localized photoirradiation with visible light at appropriate wavelength and dose. Photoactivation of the photosensitizer results in the formation of photosensitizer excited state that transfers its energy to surrounding molecular oxygen and leads to the local production of reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen ( $^1O_2$ ). Such highly cytotoxic species induce cellular damage leading to an alteration of the tumor vasculature and tumor cells death [15–17]. PDT is usually described as an alternative treatment modality for cancer and various other diseases [17,18]. Increasing evidences indicate that the use of nanoparticles as carriers of photoactivatable molecules seem to be a very promising approach to satisfy a large number of the requirements for an ideal targeted PDT [8,19,20,14].

The commonly used cell viability assays to evaluate *in vitro* cytotoxicity and photosensitizing ability of the photoactive compounds are based on the determination of cell metabolism activity. These include several methods mainly based on the quantification of intracellular adenosine triphosphate, or the reduction of tetrazolium salts to formazan dyes by mitochondrial dehydrogenases in viable cells. However, these methods, known as single end-point qualitative measures, are incompatible with experimental treatments that may directly influence and/or modulate cellular metabolism, mitochondrial activity, mitochondria intracellular mass [21,22], or cell adhesion, proliferation and migration abilities. It has been reported that some substances, predominantly redox active compounds, can react with formazan dyes, bringing misleading information on cell viability [23]. These limitations are furthermore relevant, in the case of nanoparticles systems that present a real lack of information regarding their potential toxicity [24]. It is known that nanoparticles as well as nanoparticles-generated ROS can interact with the assays reagents and interfere with the readout [25,26]. Moreover, growing reports suggest the importance of exposure/interaction time factor to take into account in studying nanoparticles-mediated cytotoxicity (for review see [25]). Such investigations highlight the need to monitor a time-dependent cell response. Furthermore, investigation of early and late effects of anti-tumor PDT generally involves the combination of various single end-point cell viability assays, which may generate discrepancies in data [27,28]. Winther et al., [28] reported inconsistency in cell survival assessed by trypan blue exclusion and the number of clonogenic cells, following Photofrin II-PDT on a retinoblastoma-like cell line.

In the present study, we have analyzed for the first time, dynamic data obtained from a real-time cell analysis system in order to investigate the cyto- and photocytotoxic effects of multifunctional nanoparticles on human breast cancer cells. This system based on impedance measurement allows on-line and continuous monitoring of cellular events. Moreover, as label-free method, the impedance-based cell analysis could be a more valuable approach since cell metabolism based assay reagents may interfere with treatment, particularly nanoparticles [25,26]. It measures electrical impedance across interdigitated micro-electrodes integrated on the bottom of cell culture plates. Impedance data are automatically converted to Cell Index (CI) values that are defined as relative change in electrical impedance created by attached cells (cellular status), and are directly proportional to cell number, cell proliferation and growth, cellular adhesion, cell size

and morphology, as well as intercellular interactions. As cells detach and die (i.e. during cytotoxic events) the cell-covered area reduces and CI values decrease [29,30]. Thus, the impedance-based cell analysis offers a multiparametric biological analysis of cell activities in real-time, providing extensive rich dynamic data about the global cell proliferation and growth dynamics.

Photodynamic activity using nanoparticles can result in the alteration of cell activities and the loss of cell viability related to photosensitizer concentration and light dose. The dynamic analysis of the nanoparticles-induced photocytotoxicity showed discriminant profiles of cell response kinetics in a photosensitizer concentration- and light dose-dependent manner. Since the real-time analysis generates a large amount of time profiles and rich dynamic information, the challenge was then to provide statistical techniques able to reduce the dimension of the inference problem and to extract the meaningful information characterizing the photodynamic effects. The main modeling challenges were firstly, to associate statistical design of experiments and biological kinetics modeling and secondly, to find out a model structure able to fit all the different dynamic cell responses, overtaking plethora of profiles. By using a parametric modeling analysis of the obtained photocytotoxicity time profiles, we deduced dynamic model parameters that completely characterized the dynamic cell response. These model parameters described distinct phases of the photodynamic response, and provided numeric information about the dynamic behaviour of cell response. Moreover, the real-time impedance based analysis of cell response allowed discrimination between early and late cellular effects thanks to the continuous monitoring. A strong relationship was also shown between the different dynamic parameters.

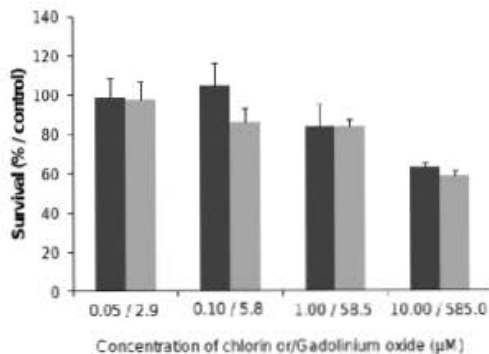
## Results

### Nanoparticles-induced Dark Cytotoxicity *in vitro*

Metabolic activity. Following exposure to the multifunctional peptide-targeted ultrasmall silica-based nanoparticles, cell viability was first determined using the colorimetric MTT metabolic activity assay on human breast cancer cells. We optimized H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR) peptide-targeted silica-based nanoparticles to target the tumor vasculature through the vascular receptor neuropilin-1 (NRP-1) [14]. These hybrid non-biodegradable nanoparticles consisted of a gadolinium chelates as MRI contrast agent, a silica shell containing the covalently grafted chlorine-type photosensitizer molecules, DOTAGA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) as an active chelator surfactant and a surface-localized ATWLPPR peptide as targeting units. Dark cytotoxicity (without light irradiation) was first assessed by MTT test in response to increasing concentrations of nanoparticles-grafted photosensitizer molecules (NP-PS) or photosensitizer-free nanoparticles (NP) (from 0.05 to 10.00 nM of chlorin, corresponding to 2.9 to 585.0 nM of gadolinium, respectively). As shown on Fig. 1, 48 h after nanoparticles exposure, cytotoxic effect was evidenced only with the higher concentration (10.00 nM/ 585.0 nM), leading to a reduction of 37% and 41% of cell survival for NP-PS and NP, respectively. No cytotoxic effect was measured (mean cell viability superior to 80%) for the cells exposed with concentrations ranging from 0.05 to 1.00 nM for both nanoparticle groups (NP-PS and NP) compared to untreated cells (Fig. 1).

Real-time impedance-based analysis. Real-time cell analysis (RTCA) system measures impedance-based signals and provides dynamic information. The cellular response was continuously monitored for 143 h in darkness from the time of nanoparticles were added. As shown in Fig. 2, electrical





**Figure 1.** Dark cytotoxicity without light exposure of nanoparticles-grafted photosensitizer (NP-PS) or control nanoparticles (NP) using MTT assay. MDA-MB-231 cells were exposed to NP-PS (dark grey) or NP (clear grey) at the mentioned concentrations for 24 h. Cell viability was evaluated by MTT assay (data points show the mean  $\pm$  SD,  $n=6$ ). doi:10.1371/journal.pone.0048617.g001

impedance measurements from adherent cells, assessed by NCI kinetics, showed no decrease in CI values whatever the nanoparticles (NP and NP-PS) concentration used as compared to untreated cells. A transient decrease of CI was recorded at 24 h post-addition, related to the temporary interruption of impedance measurement during the washing step performed to washing off the un-internalized nanoparticles (Fig. 2). However, 60 h after nanoparticles exposure, CI kinetics were clearly modified, showing an evident time-dependent decrease of CI for all the concentrations tested as compared to control (Fig. 2).

Statistical modeling of the dynamic cell response. A multivariate analysis of variance (MANOVA) associated with a canonical analysis was applied to the NCI values in order to identify the time regions of interest, for which the largest difference of NCI between the six groups of concentration may be observed, i.e. the most informative parts (Fig. 3). All measurement time instants (from 25 to 120 h following nanoparticles exposure) were projected into a canonical map, which summarized more than 95% of the total variance information contained in the original data. The analysis of the first canonical axis revealed the importance of a first time region of interest (group 1; G1) corresponding to the end part of the experimentation period ( $T < 120$  h). According to the second axis, another group (G2) was also selected around  $T < 45$  h. These two time regions were identified for the two sets of experimentation (Fig. 3A–B). Two one-way ANOVA were then performed upon the NCI values at the identified time instants  $T_1=45$  h and  $T_2=120$  h for the six groups of concentration in order to assess nanoparticles concentration-dependent cellular effects (Fig. 4). At  $T_1=45$  h, no statistically significant mean variation was detected between the six concentrations of NP-PS and NP. However, at  $T_2=120$  h, a statistically significant decrease of NCI values was observed in a concentration-dependent manner (Fig. 5). Most of the NCI median values were below the NCI initial level, revealing a significant cytotoxic effect ( $p=7.78e-09$  and  $1.11e-08$ ) of the NP-PS and NP, respectively. Such an alteration of cell proliferation was measured for both nanoparticle sets, indicating no direct effect of the photosensitizer molecules conjugated in nanoparticles (Fig. 5).

### Photocytotoxicity Profiles

Photodynamic treatment involves the uptake of photoactivatable molecules (photosensitizers) by cells and subsequent localized photo-irradiation with visible light at appropriate wavelength and dose. Optimization of both photoactivatable molecules concentrations and light doses with respect to the target cell response is required for an optimal photodynamic effect. The dynamic response of the MDA-MB-231 cancer cells, overexpressing NRP-1 receptor [31], exposed to increasing concentrations of NP-PS and various light doses was performed using the real-time impedance-based analysis (Fig. 6). As expected, according to our findings from dark cytotoxicity analysis, no decrease in CI values was observed during the first 24 h post-exposure to NP-PS before light irradiation (Fig. 6, left panel). However, CI kinetics obtained during the time interval of [25–55] h post-irradiation with various doses of light (1, 5 or  $10 \text{ J/cm}^2$ ) clearly showed discriminant profiles (Fig. 6, right panel). According to nanoparticles concentrations and light doses, kinetic profiles showed a transient or a persistent decrease of NCI (Fig. 6). Distinct phases of cell response along the post-irradiation period can be highlighted. For instance with low concentrations and/or light doses (eg 1 nM and  $1 \text{ J/cm}^2$ ), a transient decrease phase was characterized, followed by an increase until the end of the measurement. On the contrary, with high concentrations and/or light doses, immediate or late decrease of NCI can also be observed from the kinetics (Fig. 6-B, right panel), showing time-dependent heterogeneous profiles of cell response. Although metabolic tests and RTCA method assess distinct cell functions, comparable conclusions at a given time (i.e. 24 h post-irradiation) in term of cell survival were measured using a cell metabolism-based assay (WST-1) performed on the same plate (Fig. 7).

Model-based analysis of the photocytotoxic response. To take a full advantage of all the information contained in the CI kinetics profiles of the post-irradiation period, we proposed to analyze the data by a parametric model, and to evaluate the model parameters as global quantitative characteristics of the complete *in vitro* cell response. The CI variable was firstly transformed into a new modeling variable called transformed cell index (TCI) to obtain quasi-linear steady-state behaviour of the CI profile. Such a variable transformation was already applied to *in vivo* data for tumor response modeling [32]. We showed that an exponential-linear equation can describe all the measured TCI kinetics profiles. This model structure is defined by three parameters:  $r$ : the steady-state growth rate,  $T$  and  $K$  as time constant and magnitude of the transient decrease of the TCI kinetics, respectively (Fig. 8). These parameters appear as fingerprint characteristics of the photo-induced cell response; the exponential part corresponds to the transient decrease phase of the response while the linear part describes its steady-state trend. More importantly, a good consistency was obtained between the experimentally measured and the predicted response profiles, as illustrated by some examples presented in (Fig. 9), corroborating the relevance of the proposed model.

The model parameters  $T$ ,  $K$ ,  $r$  were then used as numeric indicators of the *in vitro* photodynamic efficiency with respect to nanoparticles concentrations ( $C$ ) and fluence levels ( $F$ ) (Fig. 10A–C, respectively). Low time constant values ( $T$ ), defined as lower than a threshold given by  $\log T = 0$ , were obtained for five photodynamic experimentations mentioned in red on the abscissa axis (Fig. 10-A), suggesting for these conditions a rapid decrease of the transient phase. These same conditions were also associated with low  $r$  values, defined as lower than  $r = 0$  (Fig. 10-B), suggesting a slow down of the steady-state growth rate of the post-transient phase. The experimental conditions ( $C, F$ ) corresponding

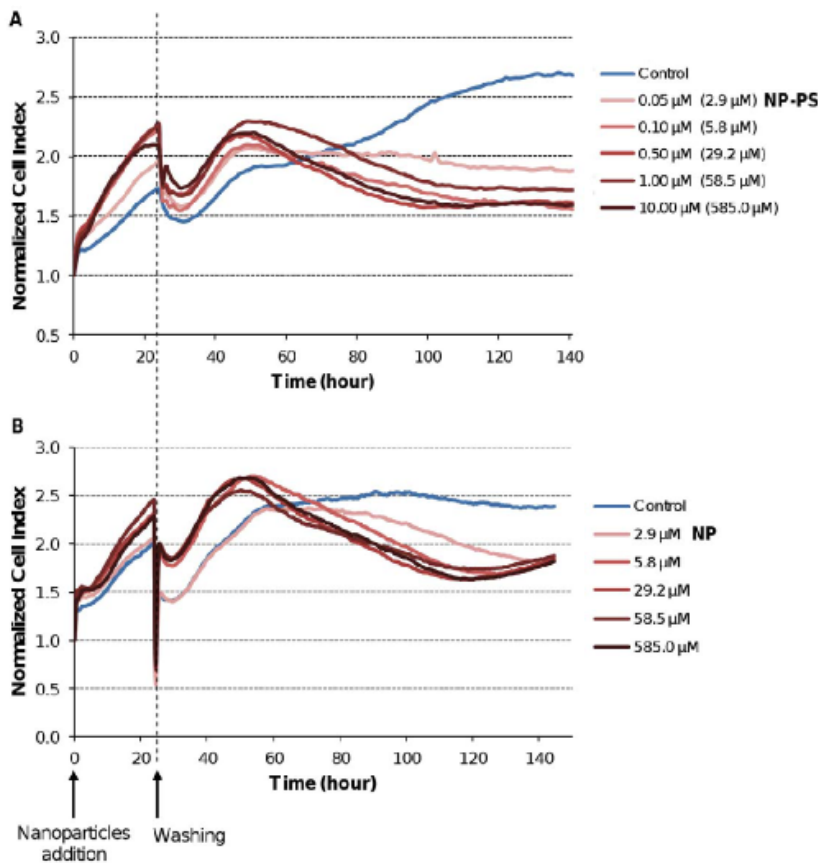


Figure 2. Normalized cell index (NCI) kinetics of the MDA-MB-231 cells exposed to nanoparticles without light irradiation. The cells were exposed to the indicated concentrations of (A) nanoparticles-grafted photosensitizers (NP-PS), or (B) photosensitizer-free nanoparticles (NP) for 24 h before washing. Cell Index (CI) was monitored during 143 h after nanoparticles exposure. Reported data are the means of six replicates. doi:10.1371/journal.pone.0048617.g002

to low  $T$  and  $r$  values also showed a tendency of correlation with the largest values of  $K$  (Fig. 10-C), indicating a deeper decrease of the TCI during the transient phase.

An efficient photodynamic effect was characterized by high  $K$ , low  $T$  and  $r$  values, suggesting a strong interaction between these three dynamic parameters and their capacity to characterize the in vitro photodynamic response. An ideal photodynamic response is characterized by a rapid and high decrease of the transient phase (low  $T$  or high  $K$ ) followed by a null steady-state growth ( $r < 0$ ) (Fig. 11, insert C). On the contrary, a lack of photodynamic efficiency is illustrated by a low decrease of the transient phase (high  $T$ ) followed by an increase in the growth rate (high  $r$ ) (Fig. 11, insert B). Based on the different values of  $T$  and  $r$  parameters, two distinct groups of C.F synergistic effects were identified (Fig. 11). The most efficient experimental conditions (Fig. 11, red group) correspond to the interaction defined by C.F \$ 2.5.

## Discussion

Using the impedance-based real-time analysis of cell proliferation with subsequent computational modeling of the experimentally obtained dynamic data, we characterized for the first time the in vitro photodynamic activity of multifunctional nanoparticles, used as photosensitizer delivery system. We optimized hybrid nanoparticles consisting of a gadolinium core, silica shell containing the covalently grafted chlorin photosensitizer, DO-TAGA chelates as surfactant and ATWLPPR peptide as surface-localized targeting units. The dynamic analysis of cell response revealed that these optimized nanoplateforms containing photosensitizer induced discriminant profiles of photocytotoxicity kinetics in a photosensitizer concentration- and light dose-dependent manner. The nanoparticles conferred photosensitivity to cancer cells, providing evidence that the photosensitizer molecules grafted within the nanoparticle matrix can be photoactivated to yield photocytotoxic effects.

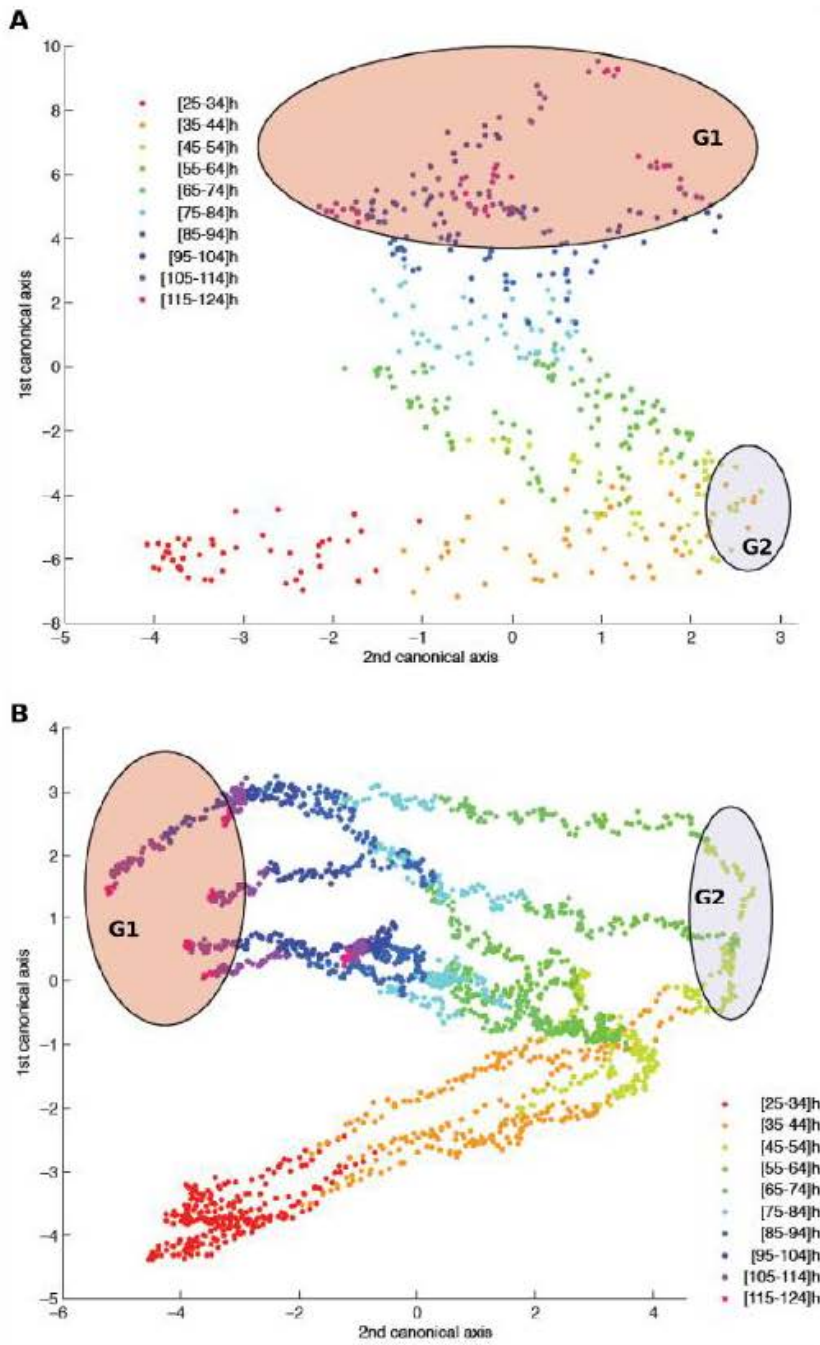




Figure 3. Canonical representation of a multivariate ANOVA with respect to the measurement time instants. The two canonical axes contain more than 95% of the total information contained in the time profiles over the study range [25–120] h presented in Figures 4A–B. According to this synthetic representation, there are two significant time regions of interest, described by blue and red ellipses. These two regions correspond to the most distant time points (with respect to the initial time instant  $t_0$ ) for the two axes. These two time regions of interest are reported in the time plots of Figures 4A–B with the same color code. Data used in this statistical analysis have been previously normalized by fixing the cell index (CI) values at 1 at initial time  $t = 0$  for all the cell cultures.  
doi:10.1371/journal.pone.0048617.g003

Although metabolic tests such as WST-1 assay and RTCA method measure distinct cell functions, comparable results were obtained using both tests, suggesting that the decrease in impedance values post-treatment was dominated by a decrease in cell viability characterizing the photodynamic efficiency of PDT. Positive relationships between both technologies have been previously described [21,29,30], suggesting the interest of combining both complementary approaches. The decrease in CI following PDT efficiency of nanoparticles may result from alterations of cell adhesion properties and impedance-based technologies such as the xCELLigence analyzer reflect cell parameters directly related to cells attachment [30]. Indeed, PDT can induce cell membrane damage and alteration in cancer cell adhesiveness mainly through the generated cytotoxic ROS (see review: [33]). Integrin-extracellular matrix (ECM) interactions lead to distinct cellular responses, such as cell proliferation, differentiation and migration. Runnels et al., [34] investigated the effects of benzoporphyrin-derivative monoacid ring A-PDT on the cell adhesion properties of human ovarian cancer cell line. After photosensitization, the authors demonstrated a loss of integrins ability to bind to ECM proteins (eg collagen IV, fibronectin, laminin and vitronectin), both *in vitro* and *in vivo* concomitantly with a loss of b1 integrin-containing focal adhesion plaques. Benzoporphyrin-derivative monoacid ring A-PDT also interfered with the ability of fibroblasts to adhere to ECM components without altering integrin expression, but associated with the suppression of focal adhesion kinase phosphorylation [35]. Similar observations in cell migration and invasion abilities have been reported by Yang et al., [36] in KJ-1 and Ca9-22 cancer cells after PDT. The expression of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) were also down-regulated in endothelial cells after PDT [37]. The effect of PDT was also studied on cadherins, a class of adhesion molecules involved in the formation of stable junctions between cells in tissues. Under apoptotic conditions, zinc (II)-phthalocyanin-PDT induced a rapid disorganization of the E-cadherin-mediated cell-cell adhesion, with the detachment of cells from the substratum via b1 integrins [33].

The time effect on nanoparticles-mediated cellular impact is accepted as an important factor to consider when describing the response [38,29]. Beside the concentration- and the light fluence-cellular effect, our study also demonstrated post-PDT time-dependent heterogeneous profiles of cell response, generating rich dynamic data. The parametric modeling analysis of the photocytotoxicity time profiles allowed the deduction of three dynamic model parameters ( $r$ ,  $T$ ,  $k$ ) that completely characterize the dynamic cell response. The consistency between the experimentally measured data and the response profiles predicted by the model, testify to the predictive ability of the proposed model. The three model parameters describe distinct phases of the photodynamic cell response, and provide numeric information about the dynamic behaviour of cell response. Taken as numeric indicators, the estimated model parameters allowed evaluation of the photodynamic cell response according to the synergistic contribution/impact between the therapeutic factors (i.e nanoparticles-grafted photosensitizer concentration and light fluence). More

importantly, according to the synergistic effects between photosensitizer concentration and light fluence, a relationship was observed between the three dynamic model parameters, indicating their potential to characterize the photodynamic cell response.

*In vitro* photodynamic activity of photoactivatable molecules is usually evaluated by the determination of the median lethal light dose ( $DL_{50}$ ) at a given time-point and for each concentration of photosensitizer, which is often quite approximate and hard to perform. Thereby, our present study using more than one quantitative parameter and more accurate quantification of the global photodynamic response provides powerful results. Although there is a growing interest for the RTCA using impedance technology, to our knowledge only two articles [39,40] have recently tried to describe the dynamic cell behaviours using mathematical and computational modeling of the impedance-derived dynamic data. Chen et al., [40] suggested an exponential time function model, reflecting profile of fibroblastic cell proliferation without any treatment. Different model parameters were estimated by fitting the measured impedance dynamic data to the proposed model. But, the proposed exponential model is not suited to describe treatment responses. Eisenberg et al., [39] characterized the precise role of myoferlin protein in cancer cell invasion using a combination of mathematical modeling and real-time impedance-based cell invasion assay. The proposed mathematical model is used to confirm or invalidate some hypothesis, owing to model simulations but little information is available about the parameters estimation method.

In the absence of light irradiation after nanoparticles exposure, we observed alterations in cell proliferation even for low concentrations of nanoparticles. We can annotate that MTT test only showed a cytotoxic effect with the highest concentration of 10 nM. This discrepancy already reported in the literature, may be mainly due to the fact that both assays measure distinct cellular activities. MTT test detects cell viability through mitochondrial metabolism, while RTCA considers cell death or proliferation, cell size, cell morphology, and cell adhesion to the well bottom as defined by cells-microelectrode contact surface [41,30,42,26,43]. This observation raises the question about the underlying mechanism of nanoparticles interaction on cellular activities. Numerous research groups have pointed out the difficulty of using the classical single-point techniques usually based on cell metabolism activity to assess nanoparticles-related cytotoxicity [25,38]. For instance, the nanoparticles as well as nanoparticles-generated ROS can indeed interact with mitochondrial enzymes activity and disturb mitochondrial metabolism-based assays. Lactate dehydrogenase cell viability assay can be affected by nanoparticles which can bind to the enzyme and impede its release into the extracellular medium [26,23,44]. Moreover, the time-dependent nanocytotoxic effects have been previously reported [38,29]. The impedance-based real-time cell analysis also revealed a late alteration of cell proliferation/adhesion induced by the nanoparticles in darkness. Such delayed cellular effect may be explained by the time-dependent cellular uptake process with such nanoparticles [45], and that nanocytotoxicity may be related to this uptake [25,29]. Thereby, as label-free method the

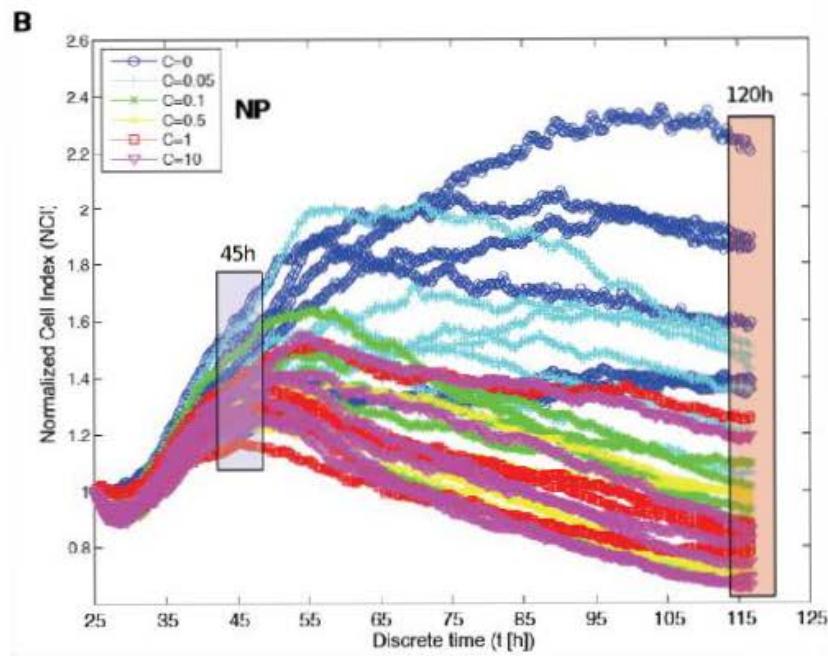
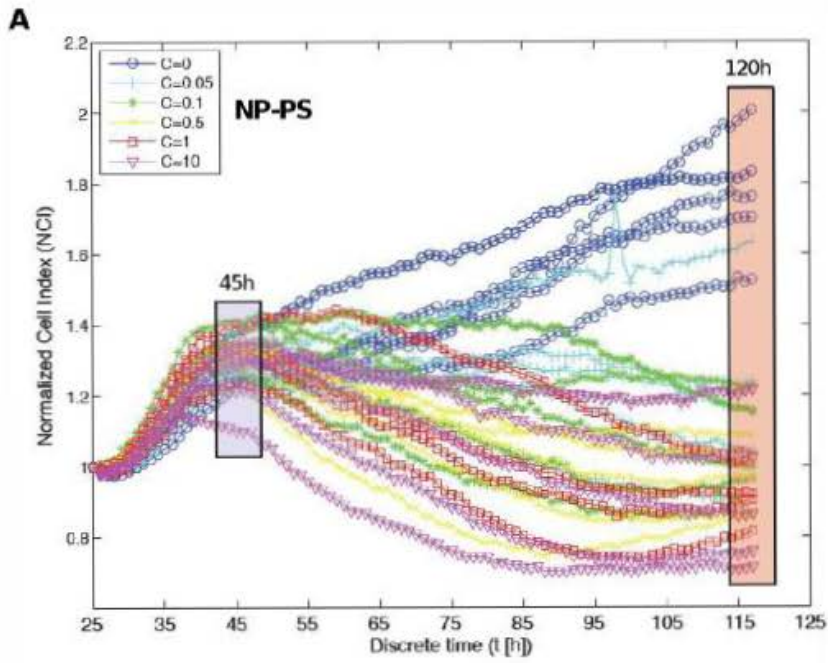


Figure 4. Study area [25–120] h of the normalized cell index (NCI) kinetics for different concentrations of nanoparticles. MDA-MB-231 cells were exposed to various concentrations of A) nanoparticles-grafted photosensitizer (NP-PS) or B) photosensitizer-free nanoparticles (NP) as described in Figure 2. Two time regions of interest, colored in blue and red, were identified by a statistical analysis (results in Figures 3A–B) as the most informative ones: around 45 h and 120 h after nanoparticles exposure. At  $t_0 = 25$  h (beginning of the study area) the NCI values are normalized at one.  
doi:10.1371/journal.pone.0048617.g004

impedance-based real-time cell analysis method offers advantages over the cell metabolism-based end-point assays, allowing continuous monitoring of nanocytotoxicity and discrimination between early and late cellular effects.

Overall, this study validates a novel approach for continuous monitoring and accurate quantification of the dynamics of cell response using nanoparticles. According to our results and as suggested by others, metabolic tests may not be adapted to measure biological effect induced by low concentrations of nanoparticles [25] compared to the impedance-based real-time cell analysis system. The computational analysis appears as

a useful tool for better understanding the dynamics of cell behaviour, such as nanoparticles-cells interactions. This analysis approach provides insights for rapid and accurate evaluation of in vitro dynamic cell response, which may help to adequately address investigations about the nanoparticle-mediated cellular effects. For the first time, the model-based approach we proposed in this study, successfully characterize the treatment response at every time point. Additionally, it provides a simple statistical analysis, focusing on only three characteristic parameters

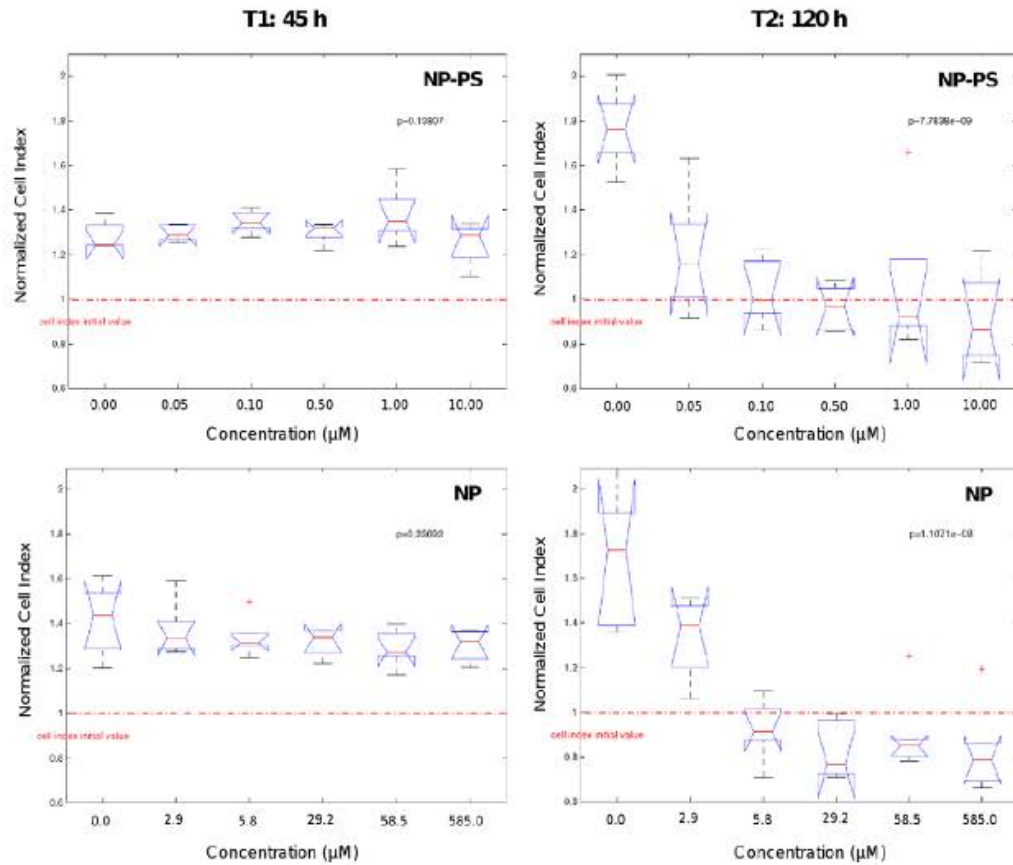


Figure 5. Analysis of variance of the normalized cell index (NCI) values at times T1 = 45 h and T2 = 120 h. This analysis was performed with respect to the indicated six concentration groups of photosensitizer into NP-PS or the six concentration groups of nanoparticles without photosensitizer (NP) at times T1 = 45 h (left panel) and T2 = 120 h (right panel).  
doi:10.1371/journal.pone.0048617.g005

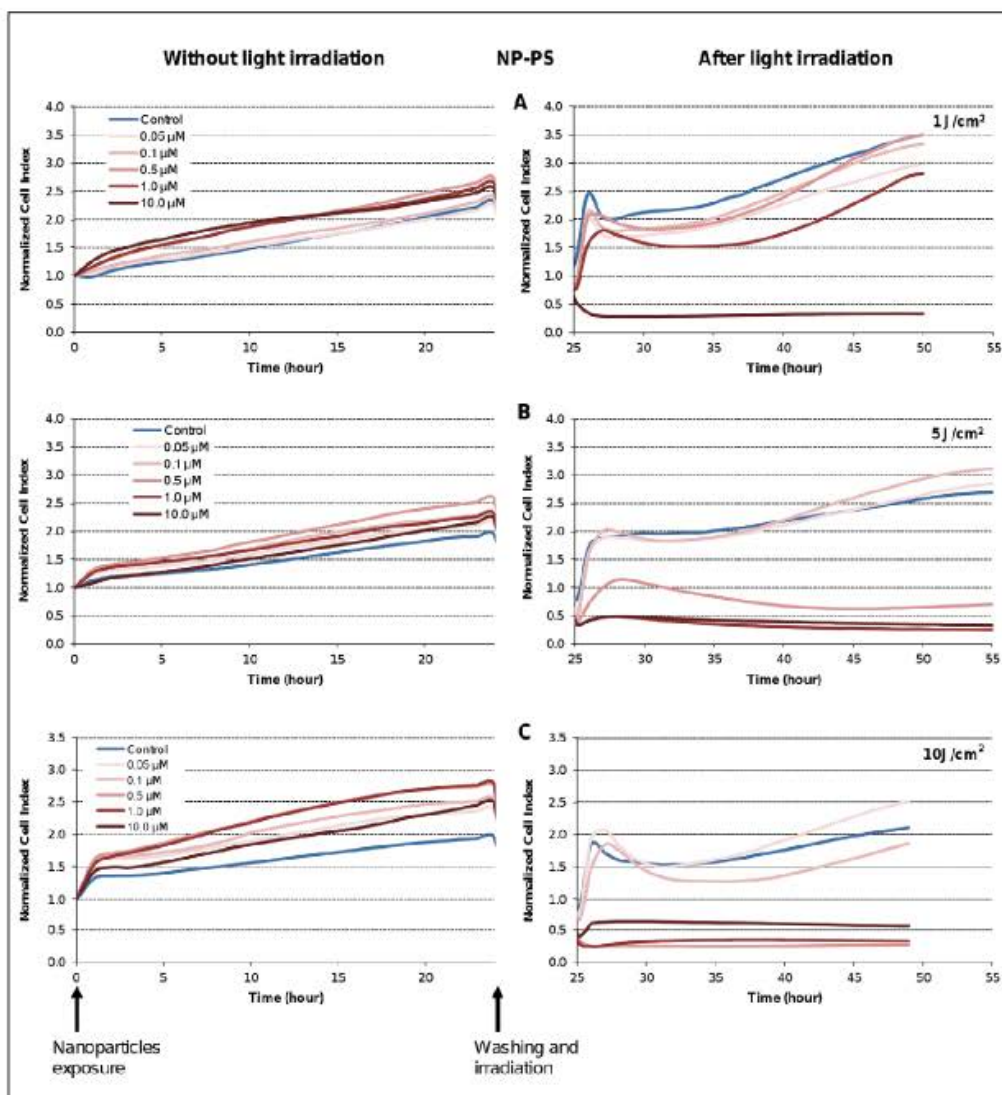


Figure 6. Kinetics of photo-induced cytotoxicity of nanoparticles-grafted photosensitizer (NP-PS) according to real-time impedance analysis. MDA-MB-231 cells were monitored for 24 h during interaction with NP-PS at the indicated concentrations of photosensitizer (left panel) before washing and light irradiation at 1 J/cm<sup>2</sup> (A), 5 J/cm<sup>2</sup> (B) or 10 J/cm<sup>2</sup> (C) (right panel). Presented cell index (CI) values are the mean of 6 replicates.

doi:10.1371/journal.pone.0048617.g006

**Methods**

**Experimental Procedure: Nanoparticles Synthesis**

The approach developed here is based on multifunctional silica-based nanoparticles, used as photosensitizer carriers and grafted to the peptide ATWLPPR targeting vascular receptor NRP-1

[31,14]. Multifunctional silica-based nanoparticles were thus designed and consisted of a surface grafted tumor targeting peptide H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (called ATWLPPR) and encapsulated a photosensitizer (PS: a chlorin, (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin, TPC) and a MRI contrast agent (gadolinium DOTAGA chelates). These nanopar-



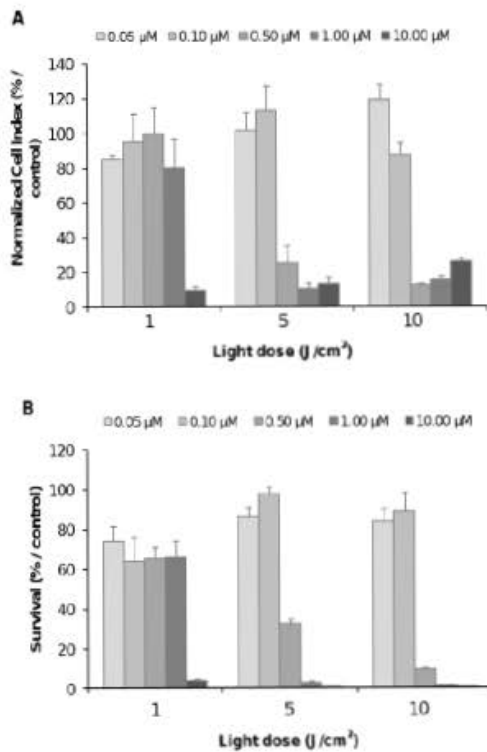


Figure 7. Photo-induced cytotoxicity of nanoparticles-grafted photosensitizer using impedance analysis and WST-1 test at 24 h post-irradiation. For impedance-based analysis (A), the MDA-MB-231 cells were exposed to various concentrations of nanoparticles-grafted photosensitizer (NP-PS) (from 0.05 to 10 nM) for 24 h followed by a washing step before exposition to the indicated doses of light. At 24 h post-irradiation, WST-1 test (B) was carried out on the same E-Plate. Data are presented as the mean  $\pm$  SE of the mean, (n = 6). doi:10.1371/journal.pone.0048617.g007

tides were noted NP-PS. To assess the nanoparticles for their own cellular effects, nanoparticles without photosensitizer and without surface targeting peptide were also synthesized and considered as control noted NP. The synthesis of gadolinium nanoparticles embedded in a polysiloxane shell has been previously and widely described by our group [13,46–49]. The top down process leading from the gadolinium oxide particles to the ultrasmall polysiloxane particles with gadolinium chelates at the surface has been recently published [49,50]. Briefly, we optimized ATWLPFR-targeted silica-based small nanoparticles grafted by gadolinium chelates for MRI and a chlorin as a photosensitizer. The nanoparticles were synthesized by a top down process. The first step is the formation of a gadolinium oxide core by a modified polyol route in diethylene glycol followed by the growth of the polysiloxane shell by a sol-gel process and then by the grafting of DOTAGA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4,7,10-triacetic) acid to the inorganic matrix via an amide function. The photosensitizer is added to the nanoparticles during the sol gel process by direct coupling of the photosensitizer to a silane

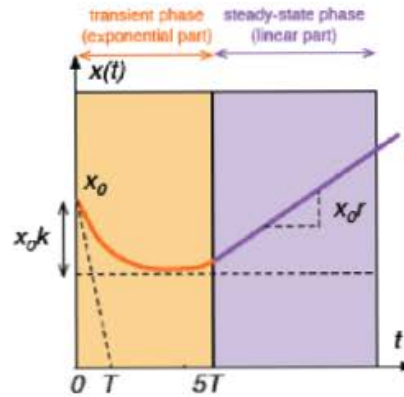


Figure 8. Exponential-Linear model structure of the transformed cell index (TCI) profile. The TQ is decomposed into two parts: a transient and a steady-state periods. This model is composed of three parameters ( $T, k, r$ ) used as quantitative indicators in the therapeutic efficiency analysis.  $T$ , time constant of the transient phase;  $K$  magnitude of the transient decrease;  $r$ , steady-state growth rate. doi:10.1371/journal.pone.0048617.g008

precursor. The dissolution of the gadolinium core and the entrapping of the gadolinium by the chelates occur during the purification in water leading to ultrasmall nanoparticles with a size inferior to 5 nanometers [50]. The ATWLPFR targeting peptide is finally grafted on the DOTAGA via an amide function [49].

Experimental Procedure: Cell Line Culture

To investigate the potential of silica-based nanoparticles to induce in vitro photodynamic effect on tumor cells, MDA-MB-231 human breast cancer cells over-expressing the vascular NRP-1 receptor were used. MDA-MB-231 cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were routinely grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1664) medium (Invitrogen, France) supplemented with 9% heat-inactivated fetal bovine serum (PAN<sup>TM</sup> Biotech GmbH, Germany), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen, France), and 2 mM L-Glutamine (Invitrogen, France) in a controlled atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidified air at 37°C in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks. Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France).

Experimental Procedure: Cytotoxicity and Photocytotoxicity Studies

In vitro cytotoxicity and photo-induced cytotoxic effects of the synthesized nanoparticles were investigated on the MDA-MB-231 cancer cells by using the standard cell metabolism-based cell viability assays (MTT and WST-1) and the real-time impedance-based analysis.

Real-time impedance-based cell analysis. MDA-MB-231 cells attachment, proliferation and size variations were monitored in real-time and measured as impedance using 96-well E-Plates<sup>TM</sup> and the xCELLigence system (Real Time Cell Analyzer Single Plate (RTCA SPH) system). The xCELLigence system was developed by ACEA Biosciences in conjunction with Roche Diagnostics GmbH (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The technology uses microwell plates whose bottoms are covered with microelectrodes as an electrical impedance cell sensor to measure the level of impedance on the surface of cell

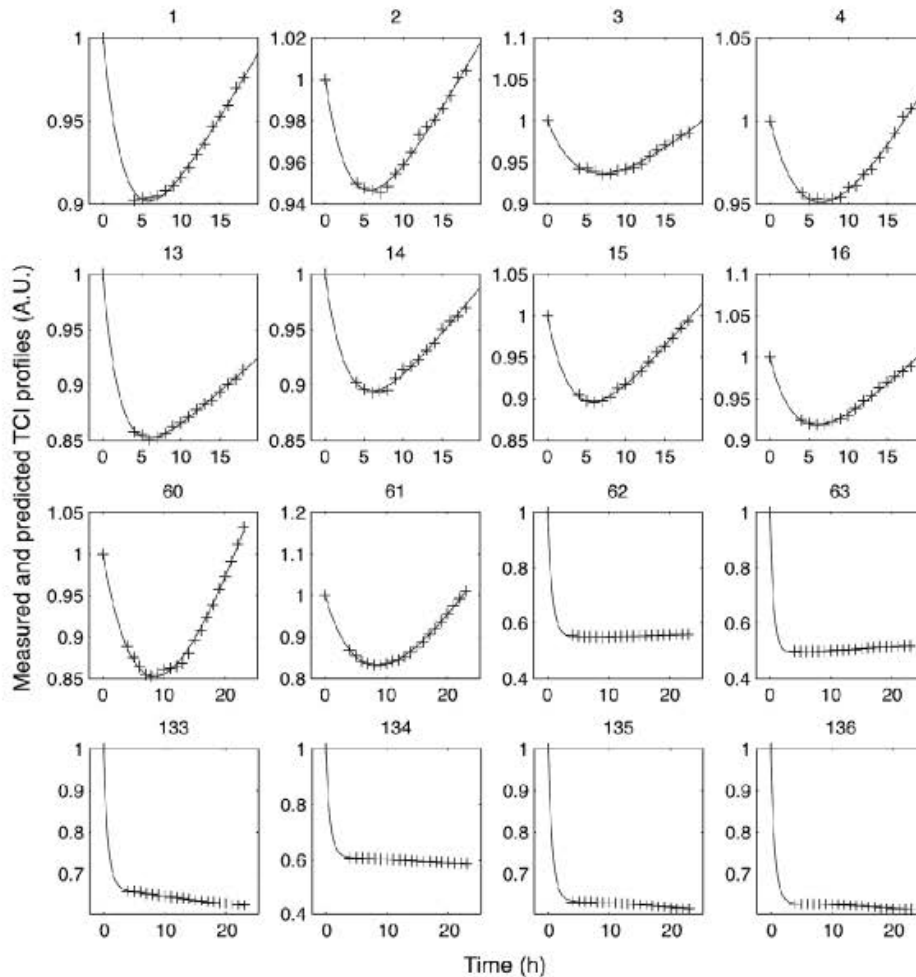


Figure 9. Model quality assessment. Comparison of measured (+) and predicted (2) responses for 16 cases among 144 time profiles of the transformed cell index (TCI). These 16 profiles sum up the variability of the cell response profiles observed between all the cell cultures. doi:10.1371/journal.pone.0048617.g009

culture plate/ well, which corresponds to the extend of cell-covered area. This method is label-free and allows real-time, automatically and continually monitoring of cellular status changes (eg adhesion, proliferation, morphology, viability) during the whole process of cell-reagent interaction. It is based on measurement of electrical impedance created by attached cells across the high-density electrode array coating the bottom of the wells [41]. Impedance value is automatically converted to a dimensionless parameter CI that is defined as relative change in electrical impedance created by cells. CI value represents cellular status and is directly proportional to number, proliferation, size, morphology, and attachment forces of the cells. As cells detach and die (i.e. during cytotoxic events) CI values decrease. The RTCA SP

Station was connected to the RTCA Analyzer and subsequently joined the RTCA Control Unit. The xCELLigence system was connected and the RTCA SP Station, in which the culture E-Plate is mounted, was placed inside the incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Then, a self check for proper electrical contact using RTCA Resistor Plate 96 was conducted prior to any experiment. All measurements were controlled by the RTCA software 1.2.1 (Roche Diagnostics).

For measurements, background impedance of the E-Plate was first determined before seeding the cells by the addition of 50 mL culture medium to each well and subtracted automatically by the RTCA software following the equation:  $CI = (Z_t - Z_0) / Z_0$  with  $Z_t$  as the impedance at any given time point and  $Z_0$  as the background



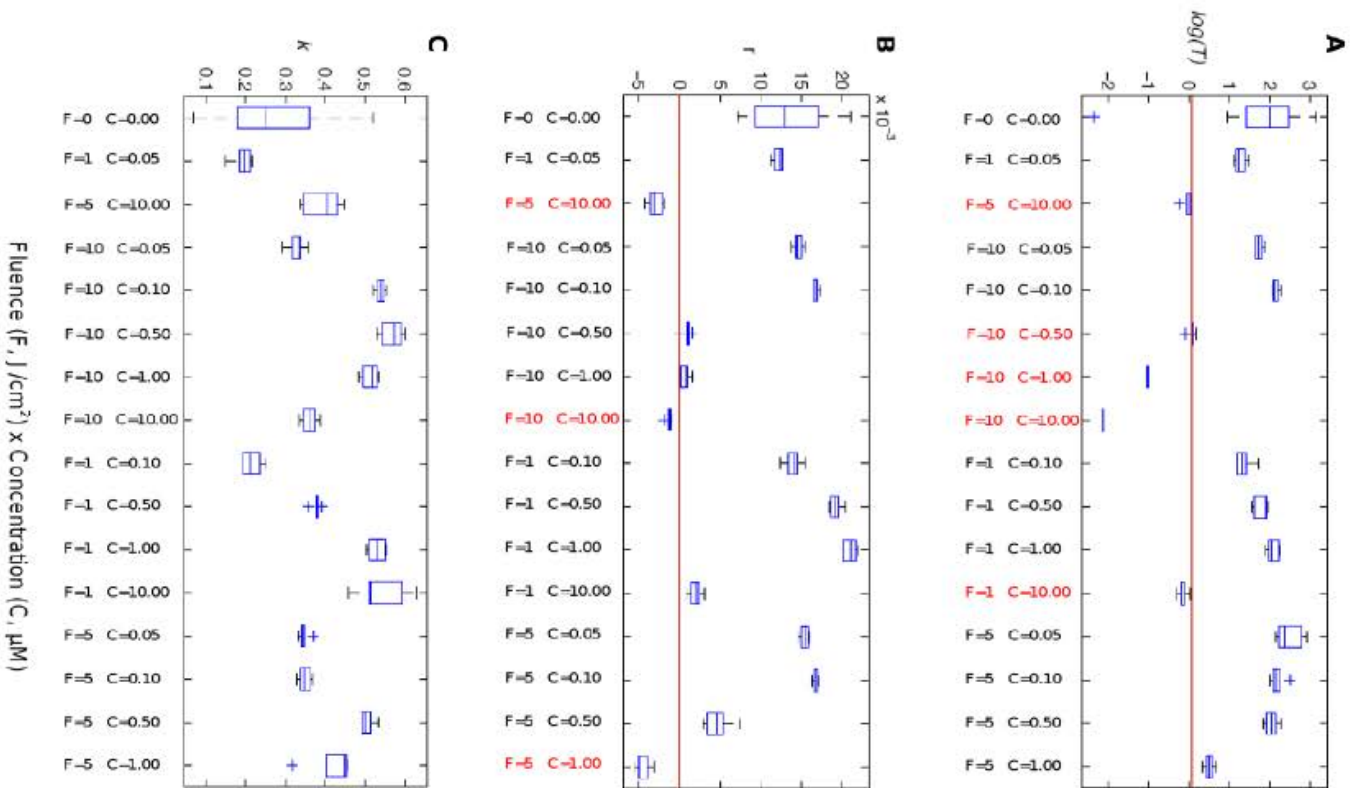


Figure 10. Synergic effects between the photosensitizer concentration, C, and light fluence, F, on the model parameters. The three model parameters ( $T$ ,  $r$ ,  $k$ ) were analyzed with respect to CF values. A) Any reduction of the time constant  $T$  suggests a faster decrease of the transient phase (positive therapeutic effect). Almost all the values of  $T$  below a reference threshold fixed to  $\log(T) = 0$  correspond to a synergistic condition defined by  $CF \leq 5$ . B) Any reduction of the transformed cell index (TCI) growth rate  $r$  suggests a slow down of the steady-state growth rate during its post-transient phase (positive therapeutic effect). Conversely, any increase of it leads to locally degrading the therapeutic response. Almost all the values of  $r$  below a reference threshold fixed to  $r = 0$  (no steady-state growth) correspond to a synergistic condition defined by  $CF \leq 5$ . C) Any positive enhancement of the magnitude of the transient decrease  $k$  suggests a deeper decrease of the TCI during its transient decrease (positive therapeutic effect). Conversely, any decrease of it leads to locally degrading the therapeutic response. The largest values of  $k$  all correspond to large values of the interaction between the concentration and the fluence.  
doi:10.1371/journal.pone.0048617.g010

signal [51]. Subsequently, a 150 mL cell suspension containing  $10^4$  MDA-MB-231 cells was seeded in each well, and allowed to settle at the bottom of wells for 20 min before starting impedance measurement in 15 min intervals 24 h after seeding. 10 mL of growth medium with or without increasing final concentrations of photosensitizer (0.05, 0.10, 0.50, 1.00 or 10.00 nM) in NP-PS or the corresponding final concentrations of gadolinium (2.9, 5.8, 29.2, 58.5 or 585.0 nM) for the control NP was added in each well, and the cultures were kept in darkness. Each concentration was tested in sixuplicate. To allow nanoparticles internalization, the cells were grown for further 24 h during which impedance was measured every 15 min. Then, the cells were washed three times with growth medium to remove the un-internalized nanoparticles. The medium was renewed by adding 150 mL of fresh growth medium. After that, the cells were either exposed to various doses of light (1, 5, or 10 J cm<sup>2</sup>) using a diode laser, Ceralas PDT 652 (CeramOptec GmbH, Biolitec, Germany) to assess the photo-induced cyto-toxicity of the NP-PS, or let without irradiation for the determination of dark cytotoxicity of the nanoparticles. Irradiation was carried out at 652 nm with an irradiance of 4.54 mW/cm<sup>2</sup>. The cell growth was then monitored for the indicated time, and impedance was measured every 15 min. Based

on impedance measurements, CI values were automatically derived and recorded as a function of time from the time of plating until the end of the experiments.

MTT and WST-1 cell metabolism-based assays. Cell proliferation and survival after incubation with the various concentrations of nanoparticles was also measured using standard single end-point metabolic assays: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (WST-1). These colorimetric assays determine the mitochondrial metabolic activity by measuring the reduction of the tetrazolium salt MTT or WST-1 to formazan crystals by mitochondrial dehydrogenases in viable cells.

To compare the photo-induced cellular effect measured with the impedance-based technology at the endpoint of the assay (25 h post-irradiation), WST-1 test was optimized and performed at the same time point on the same E-Plate. Briefly, at the end of the impedance measurement (25 h post-irradiation), 15 mL of cell proliferation reagent WST-1 (Roche) was added in each well of the E-Plate (1:10 final dilution, according to the manufacturer's instructions). The cells were then incubated at 37°C for 1 h. Formazan crystal generated from the reduction of

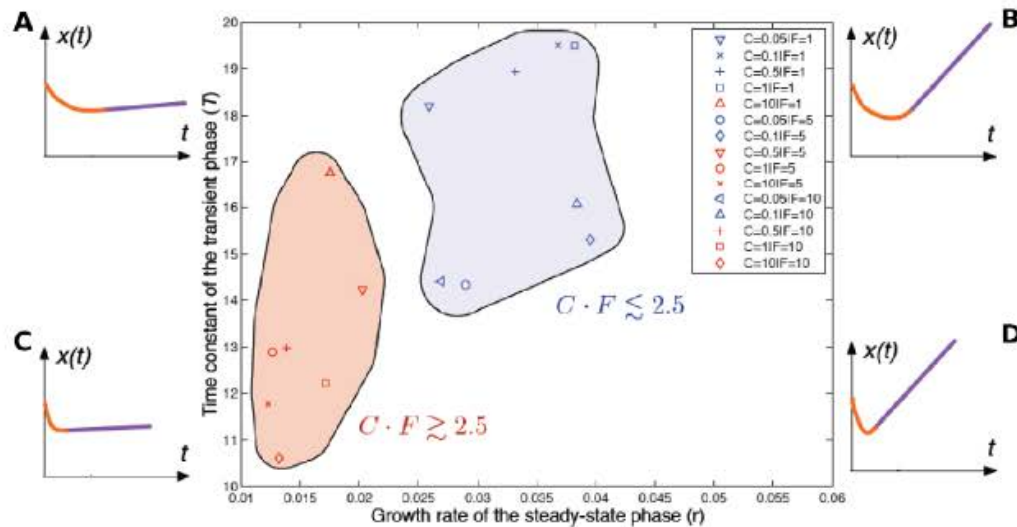


Figure 11. Profile of the photodynamic effects based on the time constant ( $T$ ) and the growth rate ( $r$ ). This synthetic representation describes both transient and steady-state effects. Corners correspond to four distinct scenarios of the therapeutic responses. The bottom left-hand corner (C) is the ideal case: a rapid decrease followed by a null steady-state growth. All the estimates of  $T$  and  $r$  are projected in this map. Two distinct groups are described by red and blue regions. The most efficient group (red group) corresponds to the values of the concentration-fluence interaction  $CF \leq 2.5$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0048617.g011

WST-1 salt was quantified by measuring the absorbance at 450 nm against a background control consisting of 150  $\mu$ L medium and 15  $\mu$ L cell proliferation reagent WST-1, using a Multiskan microplate reader (Labsystem, Cergy-Pontoise, France).

In parallel, MTT single-point test was also performed to assess the dark cytotoxicity of the nanoparticles using standard 96-well flat-bottomed microtiter plates, as previously described [49]. Similarly to WST-1 assay, cell viability was expressed as the percentage of the controls cultivated under the same conditions without nanoparticles exposure.

#### Statistical Methods/Model-based Analysis of the Dynamic Data

**Design of experiments.** As described above in the experimental procedure, we investigated the cytotoxicity of the NP-PS and NP, and the photocytotoxic activity of the nanoparticles-containing photosensitizer (NP-PS) in dynamic manner using the impedance-based technology. Two therapeutic factors of PDT were examined in this study:

**N** the fluence (spatial density of light energy, or dose of light), noted F, decomposed into four levels {0; 1; 5; 10} J cm<sup>-2</sup>;

**N** and the concentration of the photosensitizing agent grafted in the nanoparticles, noted C, decomposed into six levels {0.00, 0.05, 0.10, 0.5, 1.00, 10.00} nM, or the corresponding concentrations of gadolinium {0.0; 2.9; 5.8; 29.2; 58.5; 585.0} nM in the control NP.

A full factorial design of experiments, composed of 24 different treatments repeated six times each (six wells per treatment), was performed to estimate and compare the effects caused by these two factors and their potential synergy on the PDT dynamic response. This response was measured by the cell index provided by the impedance-based real-time cell analysis system (xCELLigence<sup>®</sup>, Roche diagnostics). This generation of biochips may rapidly generate a large amount of time profiles and a first challenge is to provide statistical techniques able to reduce the dimension of the inference problem. Two approaches have been developed herein for two different applications: the automatic selection of time regions of interest for cyto-toxicity analysis, and a parametric modeling of the CI kinetics profiles for the photocyto-toxic response analysis.

**Selection of time regions of interest.** In a first step, a study area is selected: [25–120] h for a statistical analysis among the whole measurement range, Fig. 3. Secondly, all the CI profiles are normalized at one at  $t_0 = 25$  h. A multivariate analysis of variance (MANOVA) associated with a canonical analysis is then applied to the normalized CI values in order to identify the time regions of interest for which the largest separation between the six groups of concentration may be observed, i.e. the most informative parts. Results are presented in Fig. 4. All the measurement time instants are projected into a canonical map, which summarizes more than

95% of the total variance information contained in the original data. The first canonical axis reveals the importance of a first time region of interest (blue group G1) corresponding to the end of the experimentation period ( $T < 120$  h). According to the second axis, another group (G2) has to be selected around  $T < 45$  h. These two time regions have been identified for the two sets of experimentation (nanoparticle with or without photosensitizer). In a fourth step, two one-way ANOVA are carried out upon the NCI values at time instants  $T_1 = 45$  h and  $T_2 = 120$  h for the six groups of concentration. Results are described by boxplots diagrams in Fig. 5.

Model-based analysis of the photocytotoxic response. The CI variable  $y(t)$  corresponding to the post-irradiation period is firstly transformed into a new modeling variable  $x(t)$ , entitled transformed cell index (TCI) and defined as

$$x(t) = \frac{r}{k} y(t); \quad (1)$$

This transformation is similar to the one previously proposed [32] to obtain a quasi-linear steady-state behaviour of the CI profile. To benefit from all the information contained in the TCI profiles, we propose to analyze them by a parametric model and to analyze the parameters as global characteristics of the complete in vitro response. In this application, the proposed model structure relies on an exponential-linear equation:

$$x(t) = x_0 + \frac{h}{k} (1 - e^{-kt}) + z e^{-t/T} + e(t); \quad (2)$$

where  $x_0$  is the initial value of the response;  $r$  is the steady-state growth rate;  $T$ ,  $k$  are the time constant and the magnitude of the transient decrease respectively and  $e(t)$  is the random output error (experimental variability) defined by a Gaussian distribution with a null mean and a standard deviation  $s$ . These three model parameters completely describe the kinetics profile plotted in Fig. 8. The exponential part:  $x_0 + \frac{h}{k}(1 - e^{-kt})$  corresponds to the transient phase of the response while the linear part:  $x(t) = x_0 + \frac{h}{k}rt$  describes the steady-state trend of the TCI kinetics. The quality of predicted response is emphasized in Figure 9.  $r$ ,  $k$  and  $T$  are used thereafter as numeric indicators of the in vitro PDT response.

**Parameter estimation.** The parameter estimation of the model parameters ( $r, k, T$ ) is carried out by nonlinear optimization algorithms implemented into the computational environment Matlab<sup>®</sup>.

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MBH HB TB. Performed the experiments: HB MT AS. Analyzed the data: TB YC HB. Contributed reagents/materials/analysis tools: CF FL OT RV TB MBH. Wrote the paper: HB MBH TB.

#### References

1. Praetorius NP, Mandal TK (2007) Engineered nanoparticles in cancer therapy. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 1: 37–51.
2. Hong H, Zhang Y, Sun J, Cai W (2009) Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano Today* 4: 399–413.
3. Koo H, Huh MS, Sun IC, Yuk SH, Choi K, et al. (2011) In vivo targeted delivery of nanoparticles for theranosis. *Acc Chem Res* 44: 1018–1028.
4. Hong S, Leroueil PR, Janus EK, Peters JL, Kober MM, et al. (2006) Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjug Chem* 17: 728–734.
5. Caruso G, Caffo M, Alafaci C, Raudino G, Cafarella D, et al. (2011) Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas? *Nanomedicine* 7: 744–752.
6. Mohs AM, Provenzale JM (2010) Applications of nanotechnology to imaging and therapy of brain tumors. *Neuroimaging Clin N Am* 20: 283–292.
7. Solomon M, D'Souza GG (2011) Recent progress in the therapeutic applications of nanotechnology. *Curr Opin Pediatr* 23: 215–220.
8. Bechet D, Couleaud P, Frochet C, Viriot ML, Guillemin F, et al. (2008) Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol* 26: 612–621.

9. Sun C, Lee JS, Zhang M (2008) Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1252–1265.
10. McCarthy JR, Weissleder R (2008) Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1241–1251.
11. Tasse C, Shaw SY, Weissleder R (2011) Dextran-coated iron oxide nanoparticles: a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnosis, and therapy. *Acc Chem Res* 44: 842–852.
12. Choukrat R, Sève A, Vandereise R, Benachour H, Barberi-Heyob M, et al. (2012) Non polymeric nanoparticles for photodynamic therapy applications: recent developments. *Curr Med Chem* 19: 781–792.
13. Faure AC, Dufort S, Josseland V, Pernat P, Coll JL, et al. (2009) Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small* 5: 2565–2575.
14. Couleaud P, Bechet D, Vandereise R, Barberi-Heyob M, Faure AC, et al. (2011) Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanomedicine (Lond)* 6: 995–1009.
15. Washaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ (1976) Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res* 36: 2326–2329.
16. Finger VH (1996) Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 14: 323–328.
17. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, et al. (1998) Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90: 889–905.
18. Verma S, Watt GM, Mai Z, Hasan T (2007) Strategies for enhanced photodynamic therapy effects. *Photochem Photobiol* 83: 996–1005.
19. Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y (2008) Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1627–1637.
20. Brevet D, Gary-Bobo M, Raehm L, Richeter S, Hocine O, et al. (2009) Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Chem Commun (Camb)* 1475–1477.
21. Vistejnova L, Dvorakova J, Haeova M, Muthny T, Veleby V, et al. (2009) The comparison of impedance-based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques. *Neuro Endocrinol Lett* 1: 121–127.
22. McGowan EM, Alling N, Jackson EA, Yagoub D, Haes NK, et al. (2011) Evaluation of cell cycle arrest in estrogen responsive MCF-7 breast cancer cells pitfalls of the MTS assay. *PLoS One* 6: e20623.
23. Ellis I, Popovich DG, Hu C, Kitts DD (2008) Evaluation of viability assays for anthocyanins in cultured cells. *Phytochem Anal* 19: 479–486.
24. Barbu E, Molnar E, Tsbouklis J, Gorecki DC (2009) The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Deliv* 6: 553–565.
25. Sonen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro JM, Parak WJ, De Smedt SC, et al. (2011) Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 6: 446–465.
26. Sonen SJ, De Cuyper M (2009) Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol Imaging* 4: 207–219.
27. Gupta S, Dwarakanath BS, Muralidhar K, Koru-Sangul T, Jain V (2010) Non-monotonic changes in clonogenic cell survival induced by disulphonated aluminium phthalocyanine photodynamic treatment in a human glioma cell line. *J Trans Med* 8: 43.
28. Winther J (1989) Photodynamic therapy effect in an intraocular retinoblastoma-like tumour assessed by an in vivo to in vitro colony forming assay. *Br J Cancer* 59: 869–872.
29. Li J, Guo D, Wang X, Wang H, Jang H, et al. (2010) The Photodynamic Effect of Different Size ZnO Nanoparticles on Cancer Cell Proliferation In Vitro. *Nanoscale Res Lett* 5: 1063–1071.
30. Quereda JJ, Martínez-Alarcón L, Mendoza L, Majado MJ, Herrero-Madrano JM, et al. (2010) Validation of xCELLigence real-time cell analyzer to assess compatibility in xenotransplantation with pig-to-baboon model. *Transplant Proc* 42: 3239–3243.
31. Thomas N, Pernot M, Vandereise R, Becuwe P, Kamaruzaman E, et al. (2010) Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties. *Biochem Pharmacol* 80: 226–235.
32. Bédagne T, Samson A, Vallois P, Wantz-Mézires S, Pini S, et al. (2010) Phenomenological modeling of tumor diameter growth based on a mixed effects model. *J Theor Biol* 262: 544–552.
33. Pazos MoC, Nader HB (2007) Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Braz J Med Biol Res* 40: 1025–1035.
34. Runnels JM, Chen N, Ortel B, Kato D, Hasan T (1999) BPD-MA-mediated photosensitization in vitro and in vivo: cellular adhesion and beta1 integrin expression in ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 80: 946–953.
35. Margaron P, Sorrenti R, Levy JG (1997) Photodynamic therapy inhibits cell adhesion without altering integrin expression. *Biochim Biophys Acta* 1359: 200–210.
36. Yang TH, Chen CT, Wang CP, Lou PJ (2007) Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro. *Oral Oncol* 43: 356–365.
37. Volanti C, Gloire G, Vanderplaaen A, Jacobs N, Habraken Y, et al. (2004) Downregulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells treated by photodynamic therapy. *Oncogene* 23: 8649–8658.
38. Mariani V, Ponti J, Giudetti G, Broggi F, Marmorato P, et al. (2012) Online monitoring of cell metabolism to assess the toxicity of nanoparticles: The case of cobalt ferrite. *Nanotoxicology* 6: 272–287.
39. Eisenberg MC, Kim Y, Li R, Adarman WE, Kniss DA, et al. (2011) Mechanistic modeling of the effects of myoferrin on tumor cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 20078–20083.
40. Chen SW, Yang JM, Yang JH, Yang SJ, Wang JS (2012) A computational modeling and analysis in cell biological dynamics using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS). *Biosens Bioelectron* 33: 196–203.
41. Kirsten SL, Atienza JM, Xi B, Zhu J, Yu N, et al. (2006) Live cell quality control and utility of real-time cell electronic sensing for assay development. *Assay Drug Dev Technol* 4: 545–553.
42. Heng BC, Das GK, Zhao X, Ma LL, Tan TT, et al. (2010) Comparative cytotoxicity evaluation of lanthanide nanomaterials on mouse and human cell lines with metabolic and DNA-quantification assays. *Biointerphase* 5: FA88–97.
43. Hanusová V, Králová V, Schröterová L, Trilecová L, Pakostová A, et al. (2010) The effectiveness of oracin in enhancing the cytotoxicity of doxorubicin through the inhibition of doxorubicin deactivation in breast cancer MCF7 cells. *Xenobiotica* 40: 681–690.
44. Sonen SJ, Brisson AR, De Cuyper M (2009) Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model. *Biomaterials* 30: 3691–3701.
45. Liu Y, Chen Z, Liu C, Yu D, Lu Z, et al. (2011) Gadolinium-loaded polymeric nanoparticles modified with Anti-VEGF as multifunctional MRI contrast agents for the diagnosis of liver cancer. *Biomaterials* 32: 5167–5176.
46. Bazzi R, Flores-Gonzalez MA, Louis C, Lebou K, Dujardin C, et al. (2003) Synthesis and luminescent properties of sub-5-nm lanthanide oxides nanoparticles. *Journal of Luminescence* 102: 445–450.
47. Bazzi R, Flores MA, Louis C, Lebou K, Zhang W, et al. (2004) Synthesis and properties of europium-based phosphors on the nanometer scale: Eu2O3, Gd2O3:Eu, and Y2O3:Eu. *J Colloid Interface Sci* 273: 191–197.
48. Louis C, Bazzi R, Marquette CA, Bridot JL, Roux S, et al. (2005) Nanosized hybrid particles with double luminescence for biological labelling. *Chem Mater* 17: 1673–1682.
49. Benachour H, Sève A, Bédagne T, Frochet C, Vandereise R, et al. (2012) Multifunctional peptide conjugated hybrid silica nanoparticles for photodynamic therapy and MRI. *Theranostics*. In press.
50. Lux F, Mignot A, Mowat P, Louis C, Dufort S, et al. (2011) Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 12299–12303.
51. Urcan E, Haertel U, Styliou M, Hickel R, Scherthan H, et al. (2010) Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 26: 51–58.

Les tests biologiques effectués sur les 13 lots de nanoparticules ont permis de collecter des données dont l'analyse a permis de déduire l'influence des paramètres du plan d'expérience sur la cytotoxicité, la phototoxicité et l'affinité des nanoparticules pour NRP-1. Cela a également permis de mettre en évidence l'interdépendance des paramètres de synthèse des nanoparticules sur les trois critères précédents.

Les résultats sont présentés sous forme de tableaux et de diagrammes. Les tableaux sont constitués de **plusieurs facteurs** représentés par un **code (U)**. Chaque facteur possède un **nombre de niveaux** (2 ou 3) qui correspond aux différents états du facteur représentant chacun **un niveau de facteur** (ex : le facteur cœur est représenté par deux nombres de facteurs (PC ; GC)).

Les diagrammes permettent de représenter, sous forme d'une **barre de longueur variable**, la part d'influence de chaque paramètre sur l'influence totale des nanoparticules (0 à 100%).

• Résultats du plan d'expérience : influence des paramètres sur la cytotoxicité

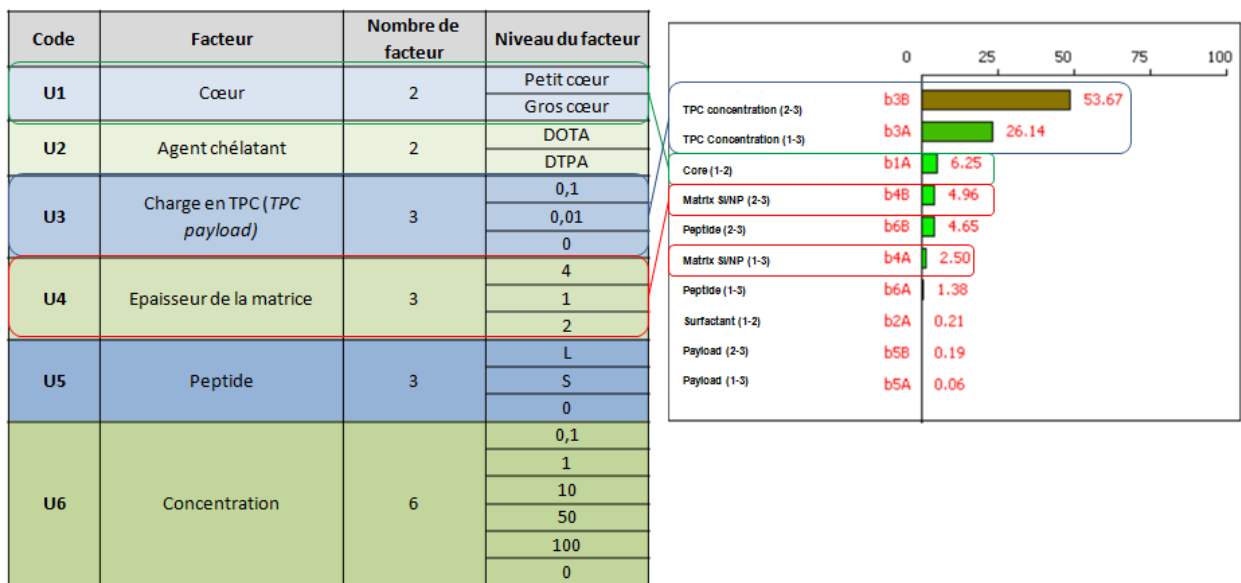


Figure 171 : Influence des paramètres sur la cytotoxicité.

L'étude de l'influence des paramètres de synthèse sur la cytotoxicité a permis de montrer qu'il n'y a pas d'effet cytotoxique des nanoparticules en l'absence de PS mais que l'effet cytotoxique mesuré est proportionnel à la concentration en TPC (Figure 171). Cette observation a également été montrée dans le cas de PS seuls [355]. De plus, il ressort que la taille du cœur et l'épaisseur de la couche de silice influencent peu la cytotoxicité (Figure 171).



• Résultats du plan d'expérience : influence des paramètres de l'interdépendance sur la cytotoxicité

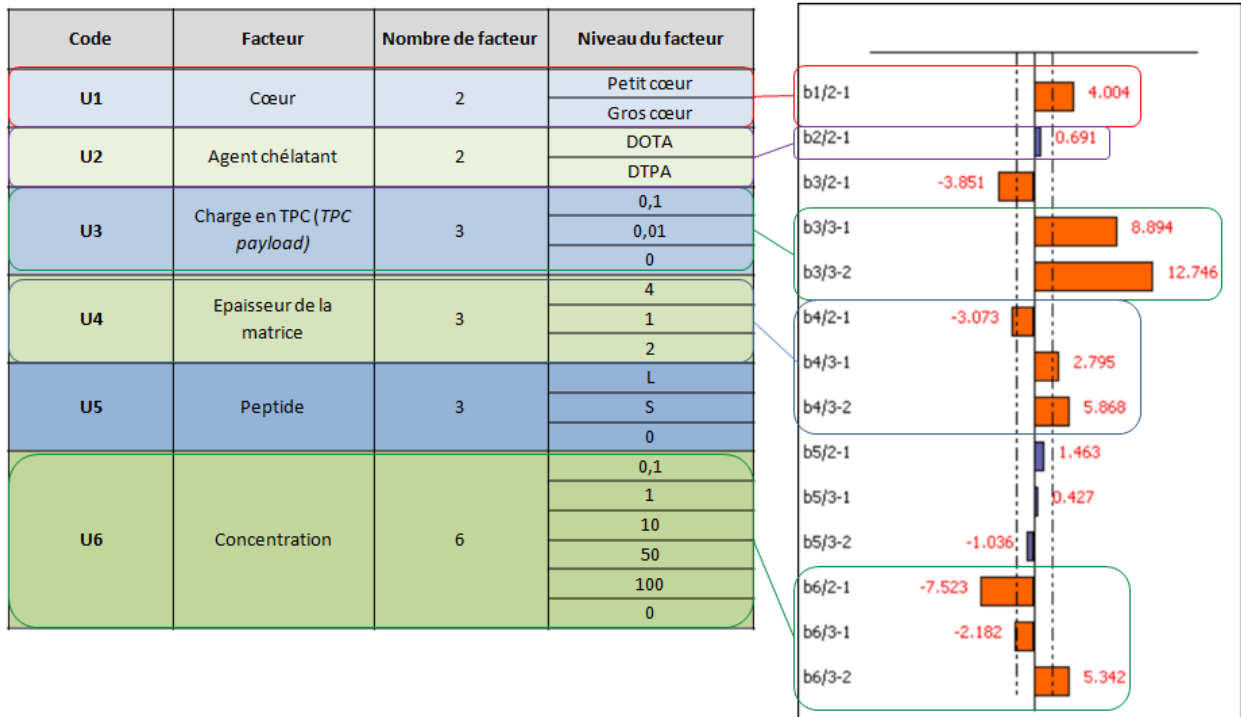


Figure 172 : Influence des paramètres de l'interdépendance sur la cytotoxicité.

L'étude de l'influence de l'interdépendance des paramètres sur la cytotoxicité a permis de mettre en évidence que l'épaisseur de la matrice de silice et la nature de l'agent chélatant influencent peu la cytotoxicité des nanoparticules à l'obscurité (Figure 172). De plus, une forte concentration en TPC et un petit cœur de gadolinium sont deux paramètres qui montrent une forte influence sur la cytotoxicité des nanoparticules (Figure 172).



• Résultats du plan d'expérience : influence des paramètres sur la phototoxicité

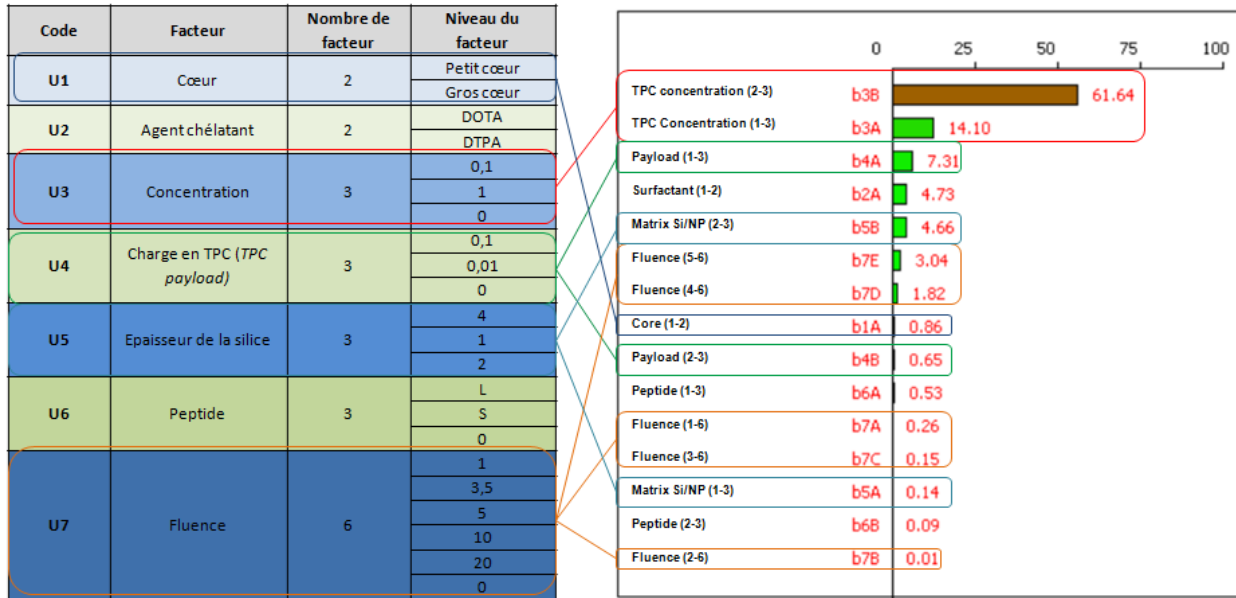


Figure 173 : Influence des paramètres sur la phototoxicité.

L'étude de l'influence des paramètres sur la phototoxicité a permis de mettre en évidence que la concentration en TPC est un paramètre influent et que ce facteur est plus influent que la charge en TPC par nanoparticule (*payload*) (Figure 173). De plus, la dose lumière, la taille du cœur et l'épaisseur de la matrice de silice constituent des paramètres peu influents sur la phototoxicité des nanoparticules (Figure 173).

• Résultats du plan d'expérience : interdépendance des paramètres sur la phototoxicité

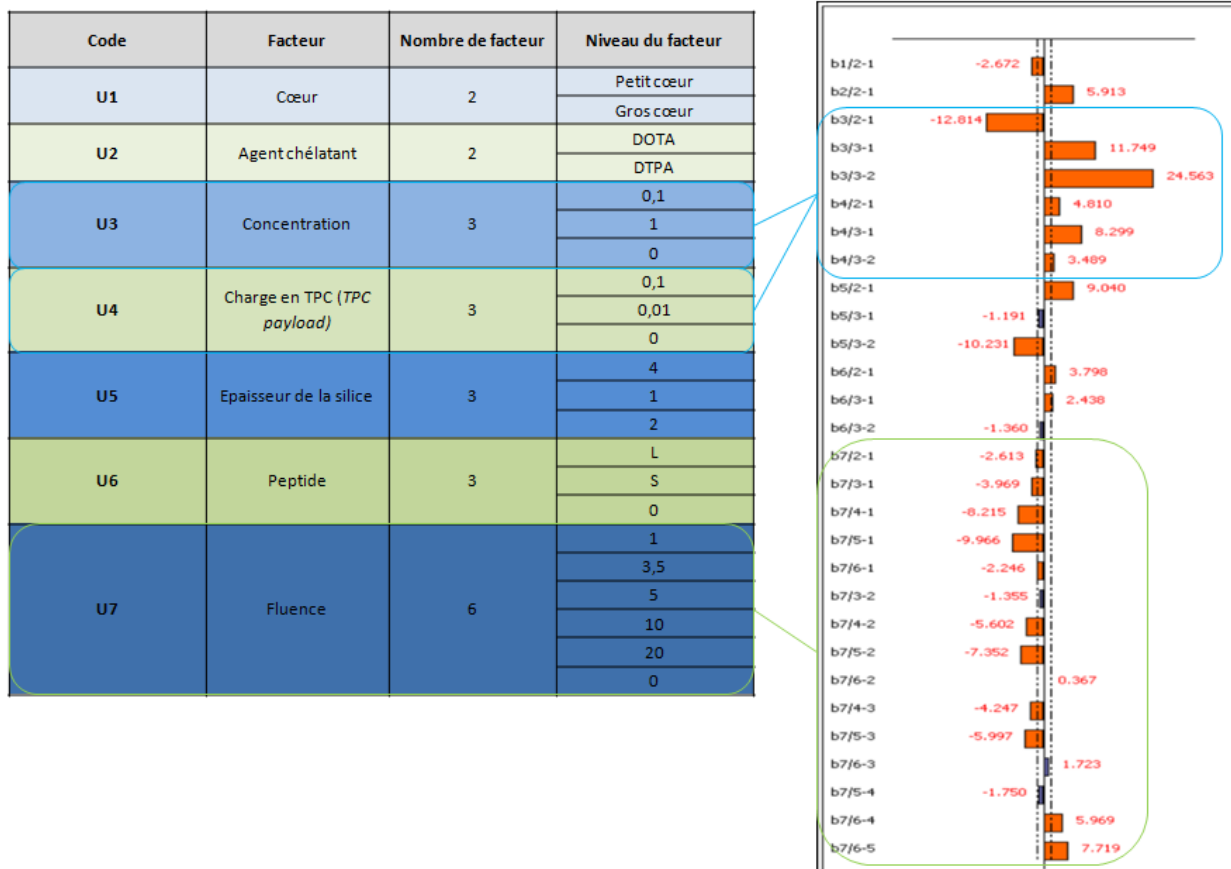


Figure 174 : Interdépendance des paramètres sur la phototoxicité.

L'étude de l'interdépendance des paramètres sur la phototoxicité a permis de montrer que la concentration en TPC influence majoritairement la réponse cellulaire (Figure 174). De plus, certaines fluences utilisées lors des tests de phototoxicité sont significatives entre elles, ce qui implique une différence d'effet photodynamique en fonction de l'énergie délivrée lors de l'irradiation (Figure 174).

• Résultats du plan d'expérience : influence des paramètres sur l'affinité des nanoparticules pour NRP-1

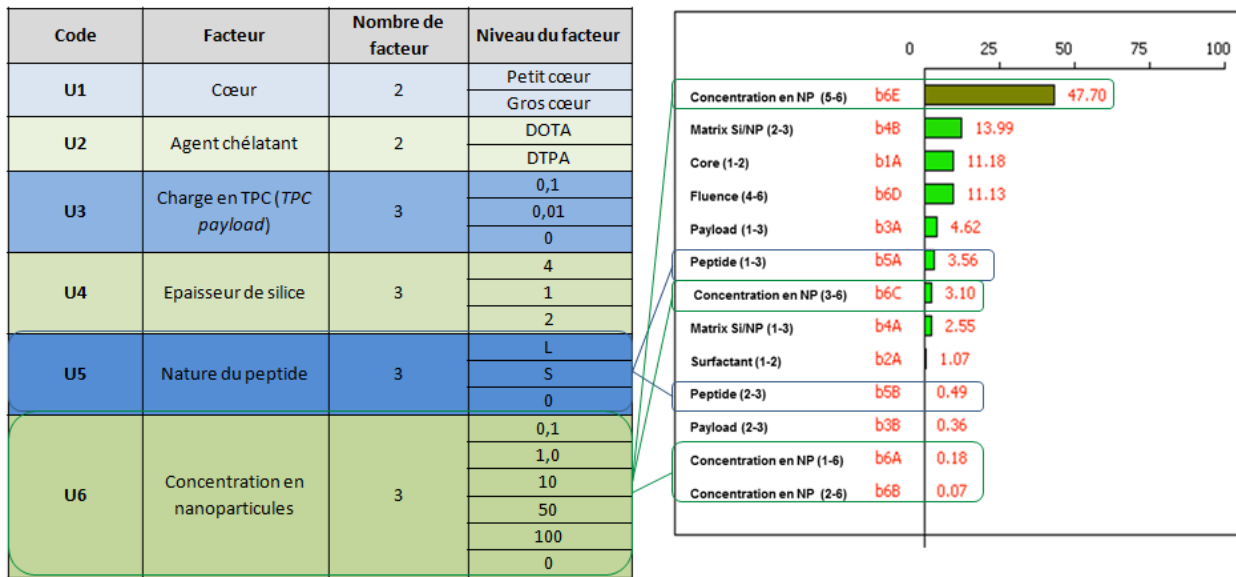


Figure 175 : Influence des paramètres sur l'affinité des nanoparticules pour NRP-1.

L'affinité des nanoparticules pour la NRP-1 est peu influencée par la nature du peptide utilisé mais la concentration en nanoparticules semble influencer l'affinité des nano-objets pour la neuropilin-1. Ceci peut être expliqué par le fait que l'accessibilité des sites de liaison est influencée par la concentration en nanoparticules, ce qui influence directement l'interaction du peptide ligand (ATWLPPR) avec NRP-1 (Figure 175).

• Résultats du plan d'expérience : interdépendance des paramètres sur l'affinité des nanoparticules pour NRP-1

Code	Facteur	Nombre de facteur	Niveau du facteur
U1	Cœur	2	Petit cœur
			Gros cœur
U2	Agent chélatant	2	DOTA
			DTPA
U3	Charge en TPC ( <i>TPC payload</i> )	3	0,1
			0,01
			0
U4	Epaisseur de silice	3	4
			1
			2
U5	Nature du peptide	3	L
			S
			0
U6	Concentration en nanoparticules	3	0,1
			1,0
			10
			50
			100

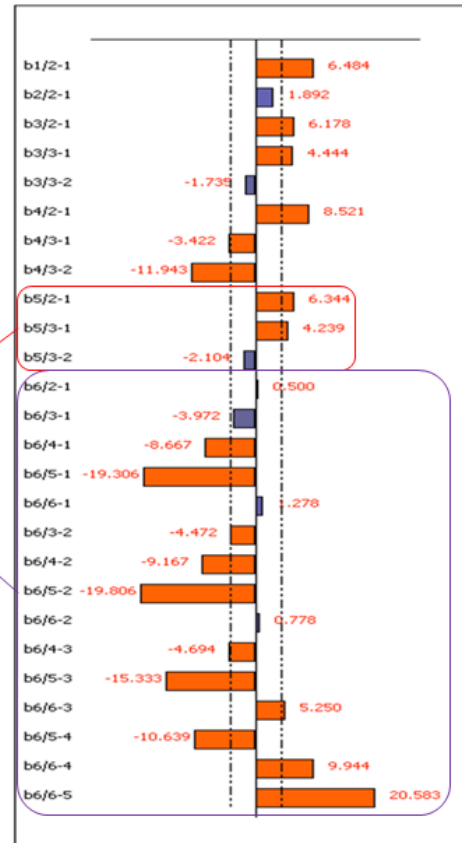


Figure 176 : Interdépendance des paramètres sur l'affinité des nanoparticules pour NRP-1.

L'étude de l'influence de l'interdépendance des paramètres sur l'affinité des nanoparticules pour NRP-1 à montré l'importance de la nature du peptide sur l'affinité pour NRP-1 (Figure 176). De plus, la concentration en nanoparticules agit fortement sur l'affinité pour NRP-1 (Figure 176).

### II. 3. a. iii. Perspectives

Afin d'augmenter les rendements de greffage de certaines étapes de synthèse des nanoparticules et également de permettre l'utilisation des nanoparticules décrites ci-dessus, il paraît intéressant de modifier la composition du cœur et de changer la manière de greffer les PS et les agents chélatants (Figure 177).

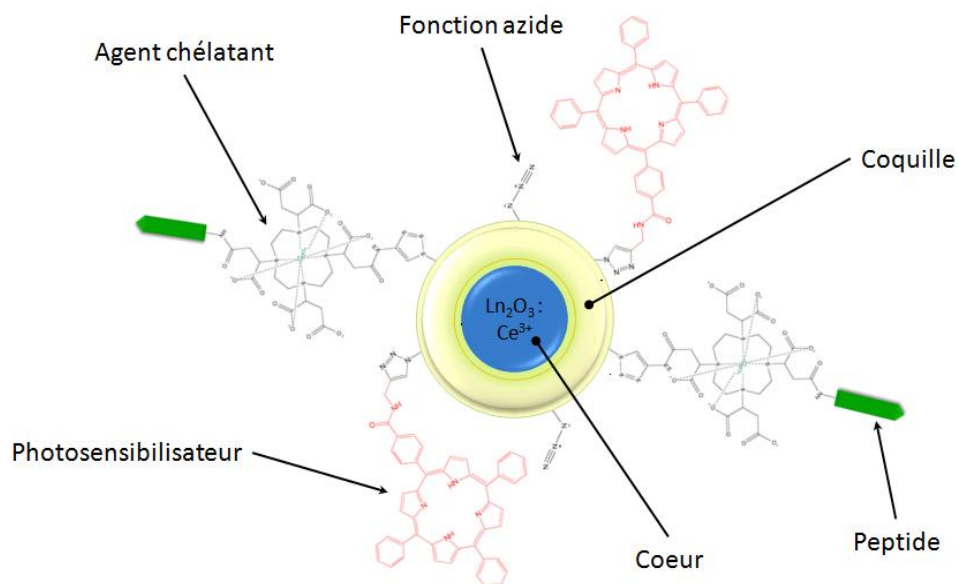


Figure 177 : Schéma d'une nanoparticule fonctionnalisée par chimie-click.

#### • Le cœur

Le cœur pourrait être modifié de manière à ce que celui-ci émette une fluorescence dans le domaine de l'UV-visible après qu'il ait été excité, avec des photons de haute énergie, permettant ainsi un transfert d'énergie au photosensibilisateur greffé. Une émission dans cette plage de longueur d'onde serait idéale pour exciter par FRET <sup>[356-358]</sup> un photosensibilisateur (de type porphyrine) dans sa bande de Soret qui, rappelons le, a un coefficient d'absorption molaire très élevé et maximum aux environs de 420 nm.

Cette excitation peut être faite de deux façons, par « *up-conversion* » (NIR) <sup>[325, 326, 359]</sup> ou par « *down-conversion* » (RX ou rayon  $\alpha$ ) <sup>[360-362]</sup>. Ces deux processus ont été exposés dans la partie nanoparticules inorganiques de ce travail.

Le mode d'excitation le plus prometteur semble être l'excitation par rayons X. Ils permettraient à terme d'exciter en profondeur des nanoparticules pour le théranostic en contrôlant l'intensité du rayonnement délivré ainsi que le volume de tissus irradié. Ceci permettrait de coupler la radiothérapie, utilisée cliniquement, à une méthode émergente de traitement, la PDT. Ce sujet est d'ailleurs l'objet du travail de thèse de Rima Chouikrat (2011-2014) <sup>[320]</sup>.

Pour qu'un matériau puisse être convenablement excité par des RX, il est nécessaire que celui-ci possède un numéro atomique et une fraction photoélectrique (proportion de photons qui interagissent avec la matière) élevés <sup>[363]</sup>. Le cœur de la nanoparticule devra donc être constitué d'un oxyde dense (ex :  $\text{Gd}_2\text{O}_3$  ;  $\text{Y}_2\text{O}_3$  ;  $\text{Lu}_2\text{O}_3$ ) qui sera dopé avec un ion luminescent, le plus souvent un ion lanthanide

trivalent (ex :  $Tb^{3+}$  ;  $Eu^{3+}$  ;  $Ce^{3+}$ ) qui émettra de la fluorescence après que le cœur ait absorbé le rayonnement incident. L'ion trivalent cérium (III) ( $Ce^{3+}$ ) me semble intéressant du fait de son spectre de fluorescence situé dans le bleu. Il se désexcite rapidement par rapport aux autres ions lanthanides (quelques dizaines de nanosecondes) et il possède un rendement lumineux élevé (en général > 10000 photons émis par MeV absorbé, en fonction de la matrice)<sup>[363]</sup>. Cependant, il est important de noter que cet ion ne fluoresce pas lorsqu'il se trouve dans une matrice d'oxyde de lutécium ( $Lu_2O_3$ ) mais que cette fluorescence est présente et située entre 350 nm et 450 nm pour un  $Ce^{3+}$  incorporé dans une matrice, de type  $Lu_xSi_yO_z$ <sup>[363]</sup>. On retrouve également cette émission dans des matrices telles que  $PrBr_3$  et  $LuI_3$ <sup>[360-362]</sup>.

### • L'enrobage

Afin de conserver le cœur intact pour que l'excitation par RX soit efficace, il est nécessaire d'effectuer un enrobage total du cœur qui soit étanche et durable dans le temps. Pour cela, un enrobage de silice tel qu'il a été pratiqué pour la synthèse des nanoparticules utilisées dans cette thèse est requis. Une proportion de 100% TMOS (tétraméthoxysilane) serait envisageable pour obtenir une coque de silice la plus imperméable possible. Les ajouts APTES/TEOS (60/40) (ou ATMS/TMOS) pourraient ensuite être effectués pour augmenter l'épaisseur de la couche de silice et pour fournir des fonctions amines libres. Afin de permettre les greffages par chimie-click en surface des nanoparticules, il serait alors nécessaire d'ajouter des fonctions  $N_3$ . Celles-ci pourront être apportées par la *L*-azidoalanine (commerciale) préalablement fonctionnalisée avec le NHS (Figure 178) (ou par l'azidobutyrate-NHS).

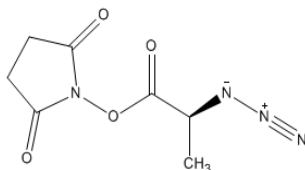


Figure 178 : Structure chimique de la *L*-azidoalanine-NHS.

### • Le greffage du photosensibilisateur et des peptides

Suite aux résultats du plan d'expérience, les taux de greffage des peptides et des PS ne sont pas optimaux. Pour résoudre les problèmes liés aux rendements de greffage du photosensibilisateur et minimiser les pertes en TPC et en peptides, une solution consisterait à utiliser une réaction d'addition « 3+2 » catalysée par le cuivre (le  $Cu^0$  ; les ions  $Cu^I$  ( $Cu(AcAc)$ ) ; les ions  $Cu^{II}$  ( $CuSO_4$  ou le  $Cu(OAc)_2$ )) entre un azide et un alcyne terminal<sup>[364, 365]</sup> (Figure 179). En effet, cette réaction, connue sous le nom de « chimie-click », qui consiste à lier deux molécules par un cycle triazole permet d'avoir des rendements de réaction proche de 100%.



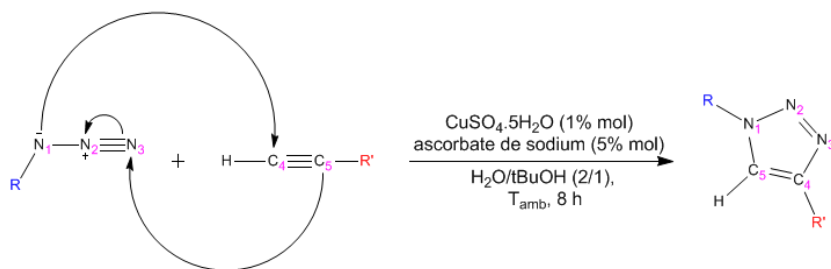


Figure 179 : Schéma réactionnel d'une addition « 3+2 », d'après la référence [364].

Nous n'aborderons ici que le cas d'une nanoparticule portant des fonctions azide ( $N_3$ ) en surface (Figure 177) mais il est bien sûr évident qu'il est théoriquement possible de faire de même avec une nanoparticule portant des fonctions alcyne en surface. Dans ce cas, il suffit d'avoir les partenaires à greffer qui portent une fonction  $N_3$  [366].

Une publication concernant la synthèse du photosensibilisateur pour la chimie-click a déjà fait l'objet d'une publication [365]. Elle consiste à ajouter une propargylamine sur la chlorure par l'intermédiaire de la fonction acide carboxylique du PS (Figure 180).

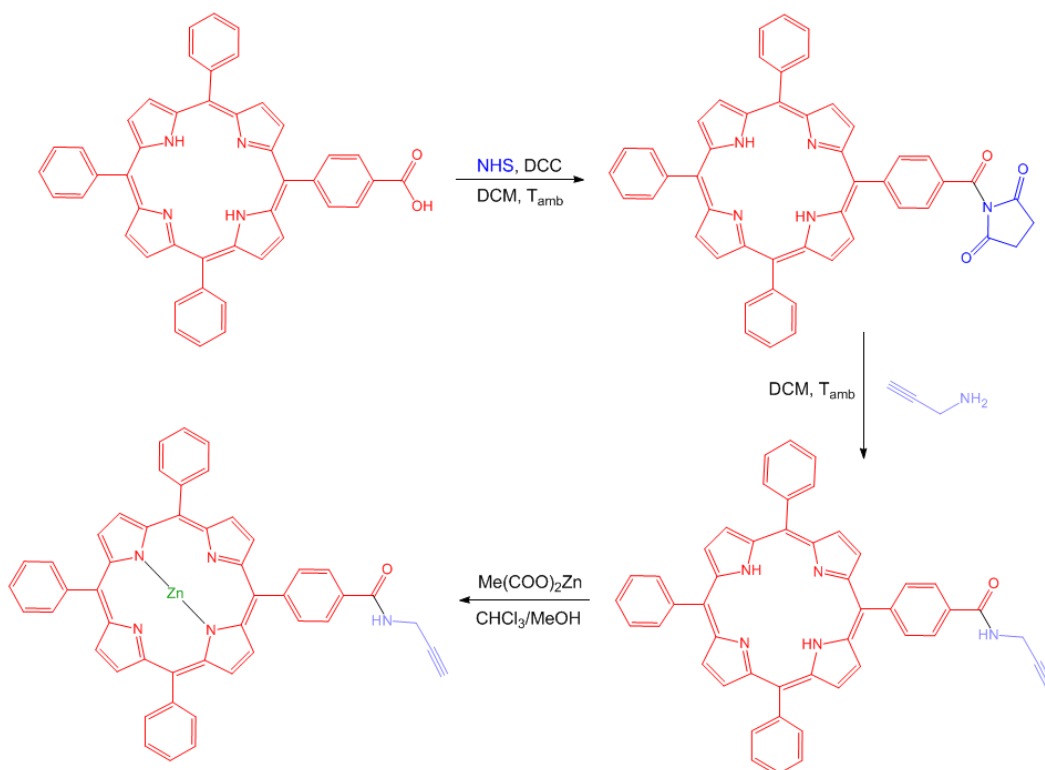


Figure 180 : Schéma de synthèse du photosensibilisateur avec une fonction alcyne, d'après la référence [365].

### • Greffage de l'agent chélatant

La méthode par chimie-click pourrait également être utilisée pour greffer les agents chélatants. La chimie-click permettrait également d'optimiser le nombre de DOTAGA autour de la nanoparticule. La première possibilité serait donc d'utiliser le DOTAGA commercial (Figure 181) et de lui ajouter un groupement fonctionnel pour la réaction de chimie-click. Pour cela, il faudra au préalable faire réagir une molécule de DOTAGA avec une molécule de propargylamine puis chélater ce DOTA-CCH avec un ion  $Gd^{3+}$  (Figure 182).

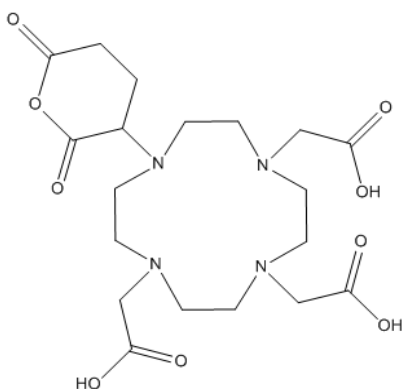


Figure 181 : Structure chimique du DOTAGA.

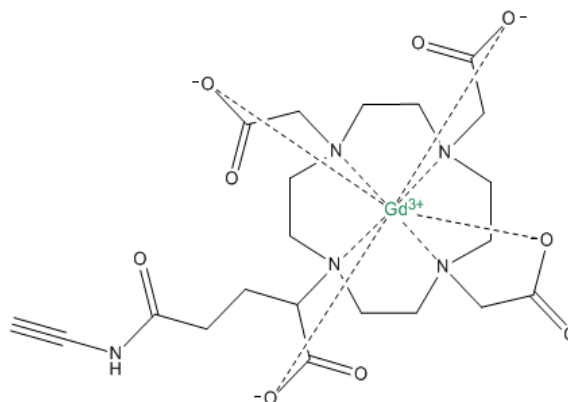


Figure 182 : Structure chimique du DOTAGA fonctionnalisé avec la propargylamine et chélaté avec un ion  $Gd^{3+}$ .

Puisque sa constante de chélation ( $K$ ) pour le  $Gd^{3+}$  étant très élevée et que sa constante de chélation pour le zinc est beaucoup plus faible que celle pour le cuivre <sup>[367, 368]</sup> (Tableau 21), il serait inutile de le zinguer avant sa fixation par chimie-click.

Tableau 21 : Tableau des constantes de chélation du DOTA pour certains cations, d'après les références [367, 368].

Cation	Log(K)	K
$Cu^{2+}$	22,25	$10^{22,5}$
$Zn^{2+}$	18,7	$10^{18,7}$
$Gd^{3+}$	24,7	$10^{24,7}$

Une deuxième façon de procéder consisterait à utiliser une molécule de cyclen (Figure 183) que l'on pourrait fonctionnaliser suivant les besoins afin d'obtenir le DOTA utilisable pour la chimie-click (Figure 184). Un agent chélatant portant huit fonctions acide carboxyliques permettrait de complexer un ion  $Gd^{3+}$ , avec un nombre de coordination de 8, en conservant des fonctions libres pour le greffage peptidique et le greffage d'une propargylamine pour la chimie-click.

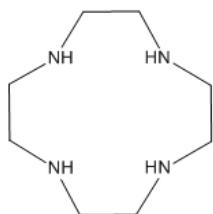


Figure 183 : Structure chimique du cyclen.

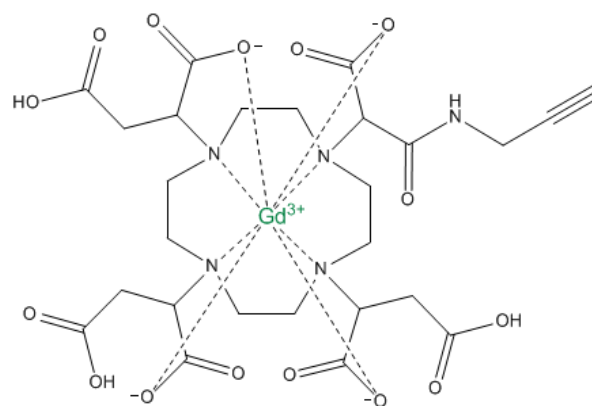


Figure 184 : Un exemple d'agent chélatant qu'il serait possible de synthétiser.

### III. Conclusion et perspectives

Avec une incidence de 2400 nouveaux cas par an en France, le glioblastome est la 3<sup>ème</sup> cause de décès par cancer chez l'adulte et le traitement des *tumeurs primaires* malignes du *cerveau* représente un des plus importants défis. Les recherches se concentrent sur la mise au point de technologies innovantes visant à éviter les dommages observés. Des cas cliniques ont montré que la thérapie photodynamique (PDT) interstitielle se présentait comme une alternative thérapeutique intéressante pour les tumeurs astrocytaires de haut grade après récurrence ou durant la chirurgie ; les îlots tumoraux persistants en marge de la cavité de résection pouvant être détruits grâce à cette technique de traitement. La finalité de cette thèse était donc de proposer une modalité thérapeutique alternative voire complémentaire par thérapie photodynamique interstitielle. Ainsi, grâce à l'optimisation de nanoparticules multifonctionnelles adaptées à une action combinée en imagerie par résonance magnétique (IRM) et en thérapie photodynamique, nous voulons développer une technologie innovante pour cibler la vascularisation tumorale, visualiser la tumeur par IRM et la traiter par thérapie photodynamique.

Grâce à un plan d'expériences, nous avons élaboré et analysé 13 lots de nanoparticules, dont la composition chimique a été modulée pour étudier l'influence de différents paramètres sur l'affinité pour NRP-1, la phototoxicité et la cytotoxicité des nanoparticules sur des cellules cancéreuses MDA-MB-231 et U87. Nous n'avons pas eu le temps d'étudier le réhaussement du signal IRM.

En ce qui concerne la partie synthèse, la fluorescence du tryptophane composant le peptide ciblant nous a permis de démontrer le greffage de peptides sur la couche périphérique des nano-objets et d'estimer le nombre de peptides greffés. Les rendements de greffage du PS estimés grâce à la fluorescence intrinsèque de la chlorine dans la couche de polysiloxane sont de l'ordre de 30%.

L'étude des propriétés photophysiques des nanoparticules nous a montré que de manière générale, une fluorescence du photosensibilisateur est conservée avant et après le greffage des peptides mais qu'elle peut être fortement diminuée pour certains lots (lot 5 et lot 6). Ceci suggère donc qu'il y a eu soit une perte de photosensibilisateur lors des étapes de purification soit un quenching de fluorescence du PS, peut être lié à la présence d'eau dans les échantillons préparés pour les mesures photophysiques. De plus, la formation d'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> dans certains lots (lot 1, lot 5, lot 8, lot 9) est non observée.

Les tests biologiques effectués sur les lots de nanoparticules restants permettront de tirer d'autres informations sur les capacités de phototoxicité de ces nanoparticules. L'analyse globale des différents paramètres de synthèse de ces lots et de leur efficacité *in vitro* permettra d'en déduire la composition chimique d'une nanoparticule la plus idéale possible pour le traitement PDT et d'anticiper, de façon théorique, ces propriétés de photocytotoxicité *in vitro*.

Une étude *in vivo* utilisant le lot 5 a démontré *in vitro*, sur des cellules du cancer du sein (MDA-MB-231), un effet photodynamique. Il a également été confirmé, pour ce lot, que la composition du cœur d'oxyde de gadolinium permettait d'obtenir un réhaussement de contraste positif en imagerie IRM et que la présence du peptide ATWLPPR greffé en surface des nanoparticules permettait une accumulation préférentielle de ces nano-objets au niveau de la néovascularisation plutôt que de manière diffuse dans la masse tumorale par effet EPR.

Dans la continuité de ce travail, plusieurs modifications peuvent être envisagées en ce qui concerne la synthèse et la caractérisation des nanoparticules.

En ce qui concerne leur synthèse, il est possible de modifier la composition du cœur des nanoparticules en ajoutant un ion dopant fluorescence à la concentration d'une impureté, ce qui permettrait d'obtenir une émission de fluorescence suite à son excitation avec les rayons X. Ce dopage pourrait être corrélé avec le changement du photosensibilisateur afin que le spectre d'émission de fluorescence du cœur de la nanoparticule recouvre, en partie ou totalement, le spectre d'absorption UV-visible du photosensibilisateur greffé à la nanoparticule permettant ainsi son excitation indirecte par les RX suivant le principe de « *down-conversion* ». Ainsi, un cœur dopé avec les ions  $\text{Eu}^{3+}$  pourrait être couplé avec une phtalocyanine afin de produire l' $^1\text{O}_2$  cytotoxique indispensable à la PDT. Ensuite, il pourra être envisagé d'utiliser la chimie-click afin d'augmenter le taux de greffage du PS dans la couche de polysiloxane qui compose les nanoparticules ce qui permettrait de diminuer les pertes en photosensibilisateur qui représentent un gaspillage de temps et d'argent. Enfin, pour favoriser la sélectivité pour les néovaisseaux, il sera possible de greffer un peptide beaucoup plus affiné pour le NRP-1 en surface des nanoparticules dans le but d'améliorer l'effet photodynamique. A cet effet, des travaux parallèles menés dans le cadre de la thèse d'Ezatul Kamarulzaman au LCPM a permis de définir deux nouveaux peptides 10 fois plus affins que ATWLPPR (résultats non publiés).

De plus, il a été montré qu'il est possible de coupler une protéine portant une fonction  $\text{NH}_2$  et un sucre portant une fonction  $\text{COOH}$  par la synthèse de Maillard à l'aide des microondes<sup>[369]</sup>. Ce procédé, couplé au synthétiseur automatique INTAVIS utilisé durant cette thèse, pourrait possiblement améliorer le rendement de synthèse des peptides, ce qui permettrait de diminuer l'excès d'acides aminés ajoutés lors de la croissance de la chaîne peptidique.

Il pourrait aussi s'avérer intéressant d'ajouter d'autres paramètres au plan d'expérience précédemment utilisé. En effet, la localisation du PS dans la nanoparticule, soit à l'intérieur de la couche de polysiloxane (avec des niveaux d'encapsulation différents) soit à la surface des nanoparticules, peut jouer sur l'efficacité photodynamique. Il pourrait également être intéressant d'ajouter un paramètre concernant le type de photosensibilisateur encapsulé dans la couche de polysiloxane afin d'assurer que le PS utilisé est le plus efficace pour la PDT après fixation dans la coque de silice. Un paramètre concernant le type de réaction utilisé pour fixer le PS et l'agent chélatant pourrait également être introduit afin de comparer l'efficacité de liaison par la réaction de liaison covalente amide avec la réaction de liaison covalente par la chimie-click.

La mesure de la diffusion de l' $^1\text{O}_2$  moléculaire de l'extérieur vers l'intérieur puis de l'intérieur vers l'extérieur de la nanoparticule suivant l'épaisseur de la couche de polysiloxane ajouterait un paramètre de caractérisation à ceux déjà établis. Pour cela, l'ATG (analyse thermogravimétrique) semble être une technique appropriée.

# Annexes

## • Les nanoparticules

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des différents types de liposomes et des méthodes de synthèse permettant de les obtenir, d'après la référence [279].

Structure du liposome	Type de liposome	Technique de synthèse		Principe de synthèse	Avantages	Inconvénients	
Unilamellaire (ULV)	Petits liposomes unilamellaires (SUV)	Méthode des ultrasons		Placer des MLV dans un bain à ultrasons	Facile	Rendement faible Dégradation possible des phospholipides et des molécules préencapsulées dans les MLV Tendance des grosses molécules à ne pas être encapsulées	
		Méthode Française de la pression cellulaire		extrusion à basse température et à haute pression à travers des petits orifices	simple, rapide et reproductible	A 4°C sous une pression de 20000 psi Les faibles volumes maximum utilisables ; Les liposomes sont quelques fois plus gros qu'avec la méthode du bain à ultrasons	
	Grands liposomes unilamellaires (LUV)	Méthode de l'injection de solvants	Infusion à l'éther	Dissolution de lipides dans l'éther diéthylique ou dans un mélange EtO <sub>2</sub> /MeOH puis injection lente en solution aqueuse contenant la molécule à encapsuler à 55-65°C et à pression réduite. Evaporer l'éther pour former les liposomes.	-	Population de tailles hétérogènes (70-190 nm) Exposition des molécules à encapsuler aux solvants organiques et à une température élevée	
			Injection d'éthanol	Une solution de lipides dissous dans l'éthanol est rapidement injectée dans un gros excès de solution tampon ce qui forme instantanément les liposomes	-	Population de tailles hétérogènes (30-110 nm) Liposomes très dilués Difficulté d'éliminer la totalité de l'éthanol du fait de l'azéotrope eau-éthanol qui peut désactiver certaines molécules encapsulées.	
			Méthode de l'élimination de détergents		Utilisation de détergents à leurs concentrations critiques de formation de micelles pour dissoudre les lipides. Le détergent est éliminé progressivement ce	Les détergents sont éliminés par dialyse, ce qui permet une bonne reproductibilité et l'obtention d'une population de liposomes de	Traces résiduelles de détergents avec les liposomes.

			qui enrichi les micelles en phospholipides et permet de former les LUV.	taille homogène.	
		Méthode de l'évaporation en phase inverse (et méthode de l'évaporation en phase inverse modifiée)	Une émulsion eau dans l'huile est formée par la sonication rapide d'un système biphasique contenant des phospholipides dans un solvant organique (éther diéthylique ou éther isopropylique ou mélange chloroforme + éther diéthylique) et une solution tampon. Le solvant organique est évaporé sous pression réduite ce qui permet former un gel visqueux. Les liposomes se forment lorsque le solvant résiduel est éliminé.	Fort taux d'encapsulation : ≥ 65% Encapsulation possible de molécules de différentes tailles (petites, grosses, macromolécules)	Exposition des molécules à encapsuler aux solvants organiques et aux ultrasons risques de dénaturation de protéines ou de cleavage d'ADN) Dispersion de taille hétérogène des vésicules
		Méthode de la fusion induite par les ions calcium	Préparation de liposomes à partir de phospholipides acides. L'addition de calcium à des SUV induit leur fusion et il en résulte la formation de structures multilamellaires possédant une configuration en spirale ( <i>cocholate cylinders</i> ). L'addition d'EDTA forme les LUV.	Encapsulation de macromolécules en conditions douces	Liposomes fortement unilamellaires fortement hétérogènes Les liposomes ne peuvent être obtenus qu'à partir de phospholipides acides
		Méthode de la microfluidisation	Technique mélangeant la microfluidisation + la microémulsification + une homogénéisation	Production à grande échelle Obtention de tailles homogènes en reprenant l'échantillon plusieurs fois avec la même méthode Processus reproductible avec un bon	La filtration de taille à haute pression (10000 psi) peut endommager partiellement les lipides Tailles : 150-160 nm après 25 cycles



					rendement d'encapsulation de phase aqueuse	
		Méthode de la congélation-décongélation	Congélation rapide suivie d'une décongélation lente	Les agrégats sont dispersés par sonication La fusion des SUV est fortement inhibée par augmentation de la force ionique du milieu et par augmentation de la concentration en phospholipides	Les vésicules unilamellaires proviennent de la fusion de SUV pendant la phase de congélation ou de décongélation Faible taux d'encapsulation : 20-30%	
Multilamellaire (MLV)	-	Méthode de l'hydratation lipidique	Solvant organique miscible avec la phase aqueuse (Méthode de Bangham)	Séchage d'une solution de lipides pour former un film fin. Il est réhydraté avec une solution tampon et passé plusieurs fois au Vortex. L'étape de réhydratation est effectuée à une température supérieure à la température de transition vitreuse des lipides ( $T_c$ ) ou à une température supérieure à la $T_c$ du constituant le plus difficile à fondre du mélange Suivant sa solubilité, le composé à encapsuler est ajouté à la solution tampon ou à la phase organique contenant les lipides.	Méthode la plus couramment employée pour obtenir des MLV Facile à préparer Grande variété de molécules qu'il est possible d'encapsuler	Volume inter des liposomes faible Faible taux d'encapsulation Distribution de tailles hétérogène
			Solvant organique non miscible avec la phase organique (éther de pétrole, éther diéthylique)	Hydratation des lipides en présence d'un solvant organique non miscible avec la phase organique. Le mélange est émulsifié par agitation vigoureuse avec un Vortex. Le solvant organique	-	Mise en contact des molécules à encapsuler avec les solvants organiques et les ultrasons

			est éliminé en faisant buller du N <sub>2</sub> dans la solution. Les MLV se forment immédiatement après élimination du solvant organique.		
		Méthode de la sphérule de solvant	<p>Disperser des petites sphérules de solvant hydrophobe volatile contenant les lipides dans une solution aqueuse.</p> <p>Les liposomes se forment lorsque le solvant organique est éliminé par évaporation contrôlé dans un bain marie.</p>	Liposomes avec une distribution de taille homogène	-

Tableau 23 : Techniques de synthèse des nanotubes de carbone, d'après la référence [283].

Type	Synthèse		Avantages	Inconvénients	Type de nanotubes formés
	Nom	Méthode			
Méthodes classiques	La méthode à arc	Utilisation d'une décharge électrique	La meilleure method pour avoir facilement des nanotubes de carbone de haute qualité du fait de la très haute température (4000 K).	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Des difficultés de reproductibilité</li> <li>- Un rendement de synthèse faible (le carbone déposé sur les parois du récipient de synthèse est constitué de nanoparticules et de débris)</li> <li>- Procédé non continu qui limite la quantité de nanotubes produits</li> </ul>	- SWCNT
	L'évaporation laser	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Synthèse à partir d'une cible de graphite pur pour les MWNT</li> <li>- Synthèse à partir d'une cible composite métal-graphite pour les SWNT</li> </ul>	Production de CNT avec des bons rendements et de qualité supérieure par rapport à la méthode à arc	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessite des lasers de puissance élevée</li> <li>- Purification nécessaire des CNT formés (les SWNT ont une répartition de diamètres non uniforme)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- MWCNT</li> <li>- SWCNT</li> </ul>
	CVD	Des particules de métal	- Le contrôle de la	- La qualité de CNT	- Formes

	d'hydrocarbures ( <i>Carbon Vapor Deposition</i> ) sous catalyse métallique	catalytique sont exposées à des vapeurs d'hydrocarbures ce qui catalyse la formation de CNT	<p>taille des particules de catalyseur permet de contrôler l'uniformité de la taille des CNT lors de la phase de croissance</p> <p>- Ce procédé permet d'obtenir une grande quantité de nanotubes</p> <p>- Dans certains cas, il est possible d'obtenir des assemblages de nanotubes bien alignés.</p>	<p>est inférieure à celles obtenues avec les méthodes à arc et à laser.</p> <p>- Grande disparité de tailles et de structures.</p>	variées de fibres de carbones, de filaments, de MWNT.
Méthodes avancées	Synthèse hydrothermale (ou solvothermale)	Initialement utilisée pour la purification des nanotubes de carbone, l'effet oxydatif de l'eau pure à 800°C and 100 MPa sur le carbone amorphe permet de synthétiser des CNT	<p>- Les CNT ne contiennent pas de carbone amorphe</p> <p>- Homogénéité du procédé hydrothermal</p> <p>- Catalyse inutile</p>	<p>- Des conditions de synthèse dures (800°C, 100 MPa, 48h)</p> <p>- MWCNT courts (≈100 nm), présence d'agrégats et de nanoparticules polygonales.</p>	- MWCNT
	Technique au CO <sub>2</sub> supercritique	Utilisation d'une forme gazeuse de carbone	Le dioxyde de carbone est non inflammable, relativement peu toxique et il possède un faible impact environnemental	Cette méthode complexe nécessite un flux continu de gaz avec une pression contrôlée et une haute température.	<p>- Structures de graphène concentrique.</p> <p>- MWCNT</p> <p>- Fullerènes</p>
	Réaction de métathèses à l'état solide	<p>Réaction d'échange entre un halogénure de carbone et un acétylide de lithium catalysée par du chlorure de cobalt</p> $C_2Cl_6 + 3 Li_2C_2 \rightarrow 8 C_{(nanotubes)} + LiCl$	<p>- Méthode simple et efficace</p> <p>- Synthèses rapides</p> <p>- Réaction d'autopropagation exothermique initiée avec un filament chaud</p> <p>- Ne nécessite que du carbone amorphe (pas de catalyse).</p>	<p>- Méthode onéreuse</p> <p>- Présence de nanoparticules de cobalt, de carbone libre et de cobalt métallique dans les nanotubes.</p>	<p>- Produits cristallins</p> <p>- MWCNT</p>

	Synthèse par flamme	Combustion de gaz carboné	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Procédé continu et peu gourmand en énergie.</li> <li>- Les SWNT peuvent être produits avec un mélange binaire ou ternaire de gaz (CO/C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>), sous catalyse métallique avec une flamme à deux étages. Ceci permet de séparer l'étape de catalyse de l'étape de croissance des CNT.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation de gaz inflammables.</li> <li>- Haute température.</li> </ul>	- SWCNT
--	---------------------	---------------------------	--	--	---------

Tableau 24 : Différentes méthodes de synthèse des nanoparticules de fer, d'après les références [296-298].

Réactifs	Méthode de synthèse
Hématite	Réduction par un mélange CO/CO <sub>2</sub>
Solution de Fe(III)/Fe(II)	Co-précipitation en milieu alcalin
	Hydrolyse
	Technique sol-gel
Complexe de fer (ex : (Fe(acac) <sub>3</sub> ), Fe(cup) <sub>3</sub> )	Décomposition thermique

• Les photosensibilisateurs

- Propriétés photophysiques des références

*TPP (5,10,15,20-tétraphényl-21,23-porphyrine)*

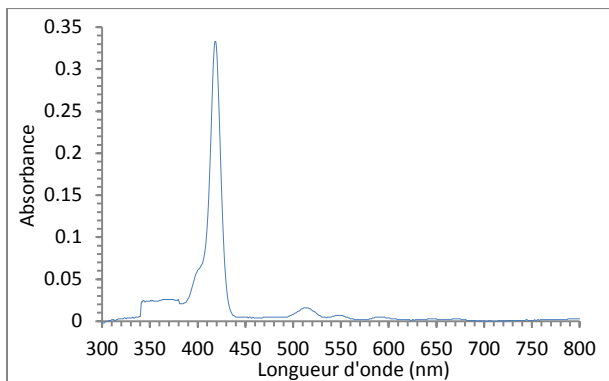


Figure 185 : Spectre d'absorption UV-visible de la TPP dans le toluène avec  $Do_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ .

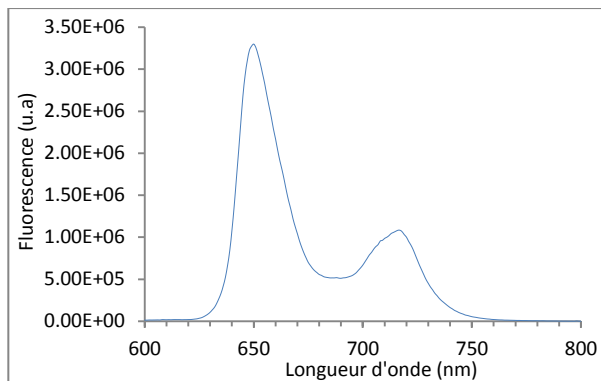


Figure 186 : Spectre de fluorescence de la TPP ( $Do_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ ) dans le toluène, excitée à 414 nm.

*Rose de bengal*

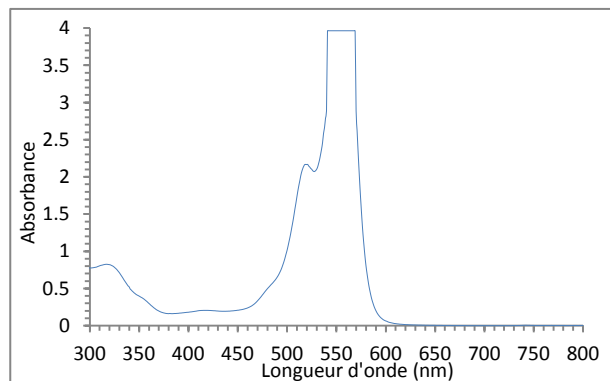


Figure 187 : Spectre d'absorption UV-visible du rose de bengal dans l'EtOH avec une  $Do_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ .

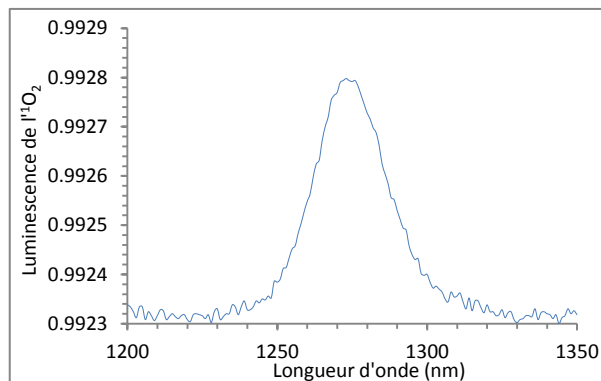


Figure 188 : Spectre de luminescence de l' $^1O_2$  après l'excitation à 414 nm du rose de bengal dans l'EtOH ( $Do_{(414\text{ nm})} \approx 0,2$ ).

Comme il a été dit précédemment, les calculs du rendement quantique de fluorescence et celui du rendement quantique de luminescence de l' $^1O_2$  nécessite de connaître les valeurs des références (constantes) dans le solvant utilisé (Tableau 25).

Tableau 25 : Tableau récapitulatif des rendements quantiques des références utilisées, d'après les références [370-372].

Photosensibilisateur	Solvant	Rendement quantique de fluorescence ( $\Phi_f$ ) (600-800 nm)	Rendement quantique de luminescence de l' $^1O_2$ formé ( $\Phi_\Delta$ ) (1200-1350 nm)
Rose de Bengale	MeOH	-	0,80
	H <sub>2</sub> O	-	0,76
	EtOH	-	0,86
TPP	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0,11	0,66

- **Purification HPLC de la TPC-COOH**

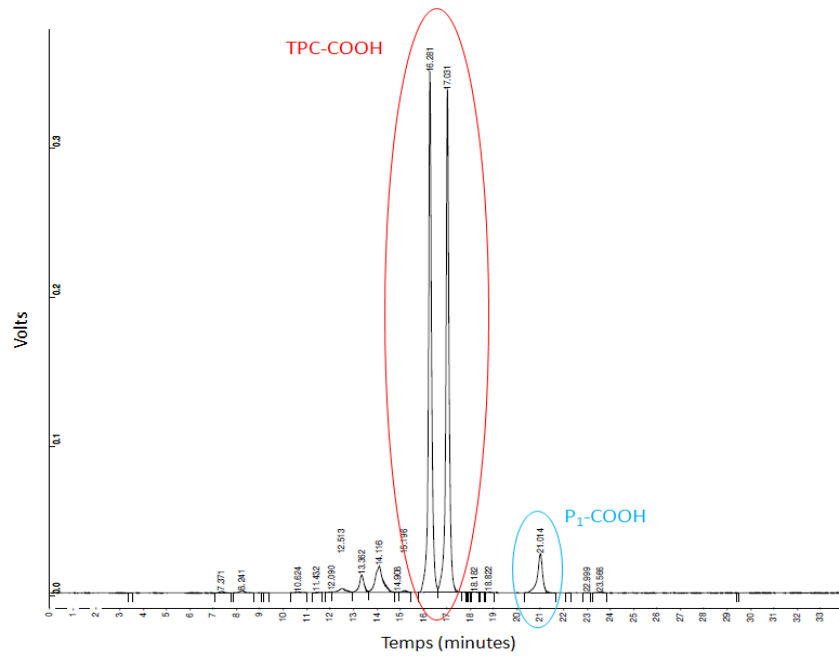


Figure 189 : Chromatogramme HPLC, en fluorescence ( $\lambda_{exc.} = 415 \text{ nm}$  et  $650 \text{ nm}$ ), de purification de la TPC-COOH avec une gradient MeOH/H<sub>2</sub>O/TFA [75/25/0,1] à [100/0/0,1] pendant 15 minutes puis MeOH/TFA [100/0,1] pendant 30 minutes.

- **P<sub>1</sub>-COOH**

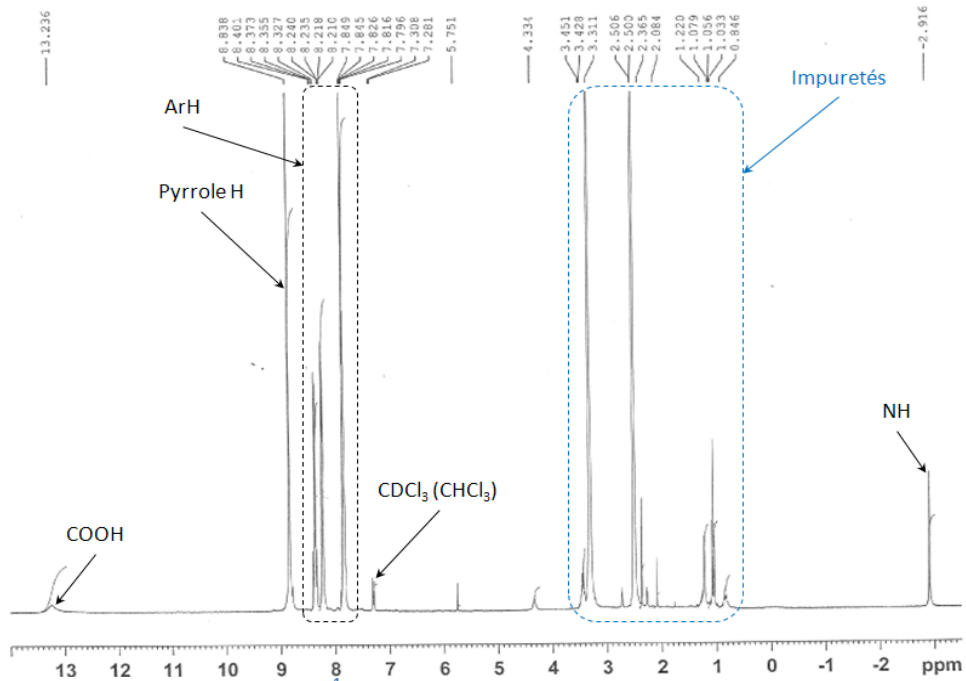


Figure 190 : Spectre RMN <sup>1</sup>H 1D de la P<sub>1</sub>-COOH dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> (300 MHz, 300 K).



- **P<sub>1</sub>-NHS**

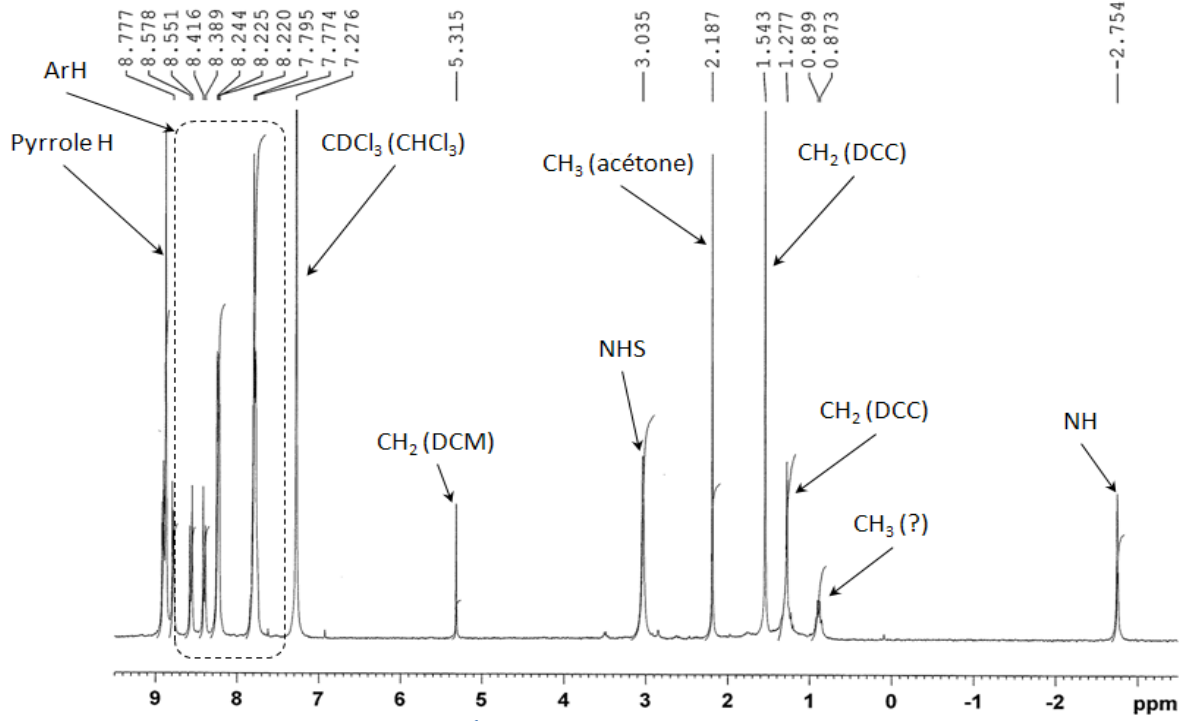


Figure 191 : Spectre RMN <sup>1</sup>H 1D de la P<sub>1</sub>-NHS dans le CDCl<sub>3</sub> (300 MHz, 300 K).

- **TPC-COOH**

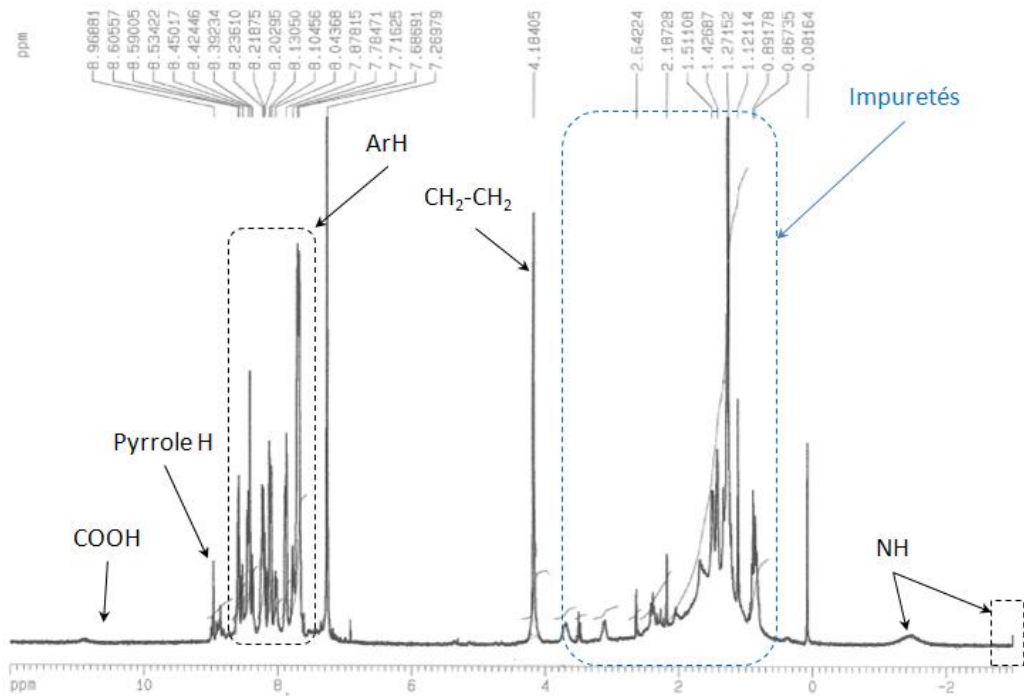


Figure 192 : Spectre RMN <sup>1</sup>H 1D de la TPC-COOH dans le DMSO-d<sub>6</sub> (300 MHz, 300 K).

- **TPC-NHS**

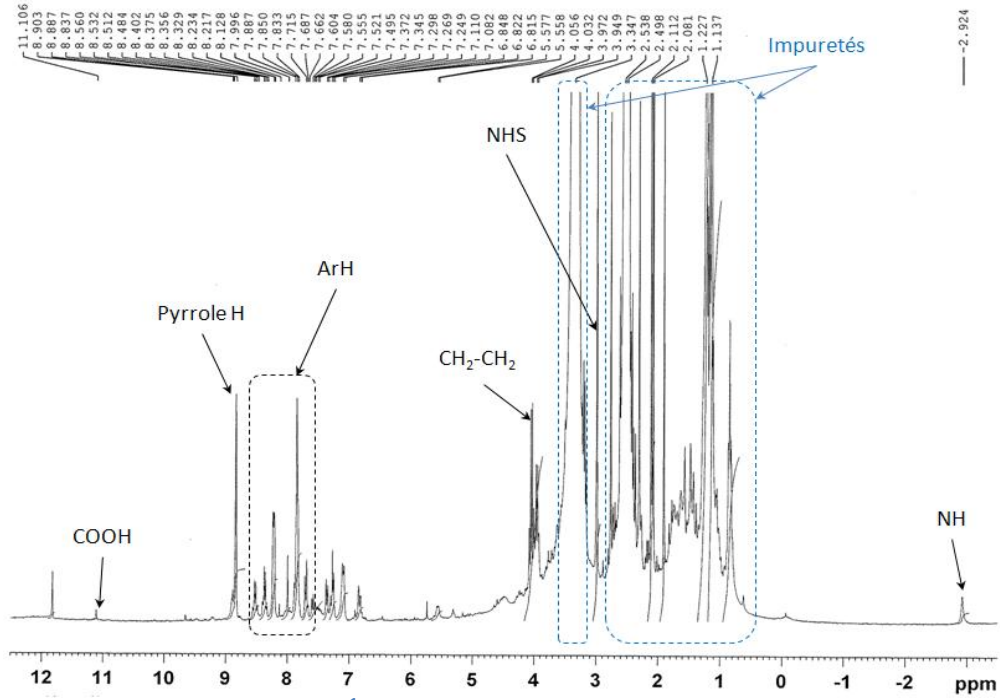


Figure 193 : Spectre RMN <sup>1</sup>H 1D de la TPC-NHS dans le DMSO-d<sub>6</sub> (300 MHz, 300 K).

• **Les peptides**

- **ATWLPPR**

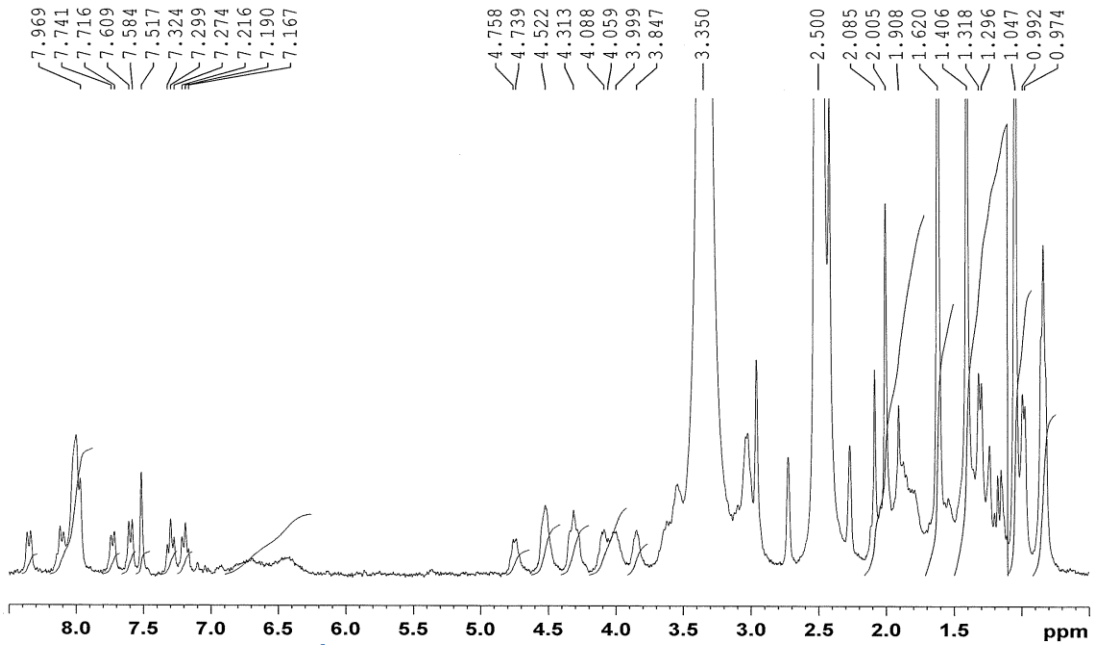


Figure 194 : Spectre RMN <sup>1</sup>H 1D du peptide ATWLPPR protégé dans le DMSO-d<sub>6</sub> (300 MHz, 300 K).

**LWRPTPA**

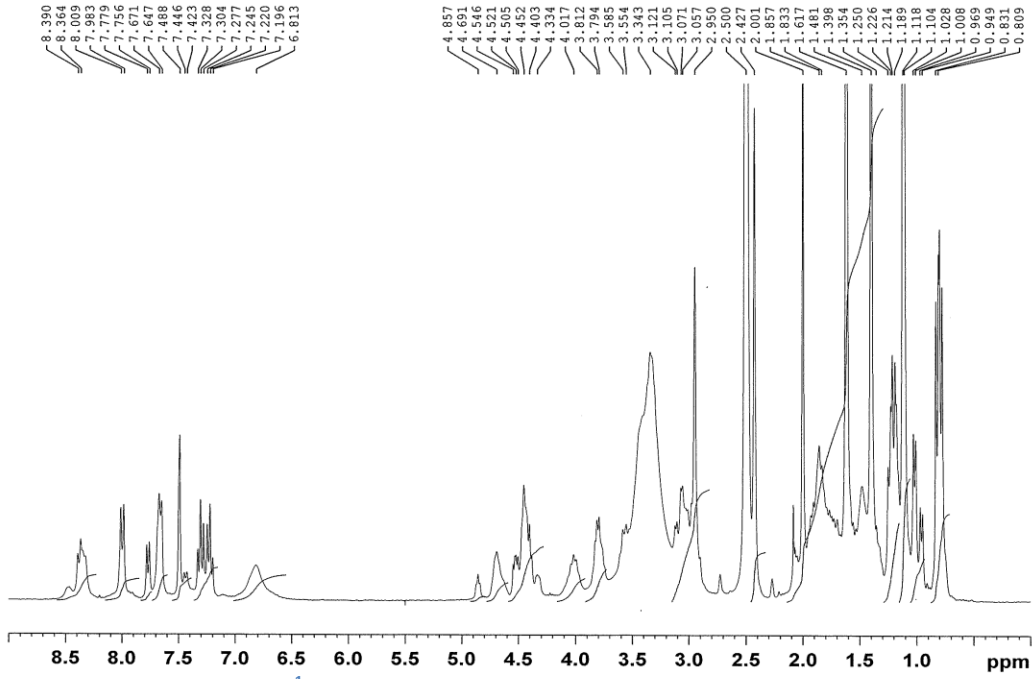


Figure 195 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  1D du peptide ATWLPPR protégé dans le  $\text{DMSO-}d_6$  (300 MHz, 300 K).

## • Le matériel utilisé

### - Mesure d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible ont été effectués sur un spectrophotomètre à double faisceau Perkin Elmer EZ 210 avec des cuvettes en quartz de 1 cm de largeur.

### - Mesure de fluorescence statique

Les spectres de fluorescence ont été obtenus en utilisant un spectrofluorimètre Fluorolog-3 (Jobin-Yvon Horiba S.A.S.) équipé d'une lampe à arc au xénon (basse pression, 450 W), d'un double monochromateur pour l'excitation, de deux doubles monochromateurs pour l'émission et d'un compartiment échantillon thermostaté par effet Peltier (effet thermoélectrique). Les mesures ont été effectuées de manière classique (angle à 90°C) avec des solutions de Do proche de 0,2 pour limiter les « effets de peau » et à une température régulée de 25 °C. La TPP dans le toluène a été prise comme référence pour les calculs de rendement quantique de fluorescence.

### - Mesure de luminescence de l'oxygène singulet

Ces mesures ont été effectuées sur un spectrofluorimètre le Fluorolog-3 mentionné au dessus, avec la même source d'excitation. La détection à 1270 nm a été effectuée à l'aide d'un monochromateur double réseau PTI S/N 1565 et d'un détecteur IR InGaAs, de la société *Electro Optical Systems INC* (modèle DSS-16A020L), refroidi à l'azote liquide. Les mesures ont été effectuées de manière classique (angle à 90°C) avec des solutions de Do proche de 0,2 pour limiter les « effets de peau » et à une température régulée de 25 °C. Le rose bengale dans l'éthanol a été utilisé comme référence pour le calcul des rendements quantiques de production d'oxygène singulet.

### - Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  ont été effectués par Olivier Fabre du LCPM, avec un appareil Bruker à 300 MHz et 300K. Le mode 1D a été utilisé pour effectuer les spectres des photosensibilisateurs. Deux modes 2D appelés COSY et TOCSY ont été utilisés pour les peptides. Le mode COSY permet de mesurer les couplages entre les atomes d'hydrogènes séparés par moins de trois liaisons et le mode TOCSY permet de le faire pour des atomes séparés par plus de trois liaisons. Les tables de référence 1D permettent d'attribuer les groupements chimiques auxquels appartiennent les protons et les tables de référence 2D des acides aminés permettent d'attribuer les acides aminés aux signaux correspondant afin d'obtenir l'enchaînement peptidique étudié. Une autre technique de RMN 2D est la NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), qui n'a pas été utilisée ici, et qui permet d'observer les couplages en hydrogène à travers l'espace et non plus à travers les liaisons chimiques de la molécule.

### - Synthèse peptidique sur support solide

Les synthèses de peptide sur support solide ont été effectuées au LCPM sur un synthétiseur automatique ResPepXL (Intavis AG) suivant la stratégie Fmoc/tBu.

### - Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les plaques CCM qui ont été employées sont à gel de silice 60 F254 (Merck Chimie S.A.S.).

- **Purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC)**

Ces purifications ont été effectuées sur une HPLC préparative Varian ProStar PrepStar 218 en phase inverse, avec une colonne C18 (Varian Pursuit, 5 µm, 250 x 21,2 mm). La détection est assurée à la fois par un détecteur de fluorescence ProStar 363 et une barrette de diode ProStar 335.

- **Dialyse**

Les dialyses ont été effectuées avec des boudins de dialyse (SpectraPor) en cellulose régénérée possédant un seuil de coupure de 1000 Da.

- **Ultrafiltration**

Les étapes d'ultrafiltration ont été effectuées sur une centrifugeuse Heraeus Labofuge 400. à l'aide de tubes Vivaspin possédant une membrane de PET avec un seuil de coupure à 3000 Da.

- **Produits chimiques**

Les solvants et les réactifs ont été achetés chez différents fournisseurs (Novabiochem, Accros, Merck, Invitrogen, SpectraPor, Carlo Erba, Sigma Aldrich). Les solvants de qualité HPLC sont des Chromasolv de chez Sigma Aldrich. Les solvants de qualité spectroscopique proviennent de chez Carlo Erba.





# Références

1. Benachour H., et al., *Real-Time Monitoring of Photocytotoxicity in Nanoparticles-Based Photodynamic Therapy: A Model-Based Approach*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. 1-15.
2. Benachour H., et al., *Multifunctional Peptide-Conjugated Hybrid Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy and MRI*. Theranostics, 2012. **2**(9): p. 889-904.
3. Chouikrat R., et al., *Non Polymeric Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications : Recent Developments*. Current Medicinal Chemistry, 2012. **19**(6): p. 781-792.
4. Sève A., et al., *Long-distance energy transfer photosensitizers arising in hybrid nanoparticles leading to fluorescence emission and singlet oxygen luminescence quenching*. Photochemical and Photobiological Sciences, 2012. **11**: p. 803-811.
5. Capasso L.L., *Antiquity of Cancer*. Int. J. Cancer, 2005. **113**: p. 2-13.
6. Olszewski M.M., *Concepts of Cancer from Antiquity to the Nineteenth Century*. History of Medicine, 2010. **87**: p. 181-186.
7. David A.R. and Zimmerman M.R., *Cancer: an old disease, a new disease or something in between?* Science and Society, 2010. **10**: p. 728-733.
8. Google. [cited 2013; Available from: <http://www.google.fr>.]
9. Brown J.R. and Thornton J.L., *XIIth International Congress on Occupational Health*. British Journal of Industrial Medicine, 1957: p. 68-70.
10. Inserm : *Institut national de la santé et de la recherche médicale*. 2013 [cited 2013; Available from: [www.inserm.fr](http://www.inserm.fr).
11. *Organisation mondiale de la Santé*. février 2013 [cited 2013; Available from: [www.OMS.com](http://www.OMS.com).
12. Plankar M., Jerman I., and Krasovec R., *On the origin of cancer: Can we ignore coherence*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2011. **106**: p. 380-390.
13. *Est Républicain*. 2013; Available from: [www.estrepublicain.fr/actualite/2013/02/04/inegaux-devant-le-cancer](http://www.estrepublicain.fr/actualite/2013/02/04/inegaux-devant-le-cancer).
14. Ravindran J., Prasad S., and Aggarwal BB., *Curcumin and cancer cells: How many ways can curry kill tumor cells selectively?* The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal, 2009. **11**: p. 495-510.
15. Avendano C. and Carlos Menendez J.C., *Medicinal chemistry of anticancer drugs*, Elsevier, Editor 2008.
16. Patrice T., *Photodynamic Therapy*, in *Comprehensive series in photochemical and photobiological sciences*, D.-P. Häder and G. Jori, Editors. 2003, Royal Society of Chemistry.
17. Grimes P.E., *Psoralen photochemotherapy for Vitiligo*. Clinics in Dermatology, 1997. **15**: p. 921-926.
18. Ramesh K., Kaur M., and Kumari M., *Acridine: A versatile heterocyclic nucleus*. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 2012. **69**: p. 3-9.
19. Lowde R.D., Phillips D.C., and Wood R.G., *The Crystallography of Acridine. I*. Acta Cryst., 1953. **6**: p. 553-556.
20. Auler H. and Banzer G., *Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren*. 1942: p. 65-68.
21. Beers R.F., *Acridine orange binding by Micrococcus Lysodeikticus*. Journal of Bacteriology, 1964. **88**: p. 1249-1256.
22. Patel B.B., Patel R.G., and Patel M.P., *Synthesis and studies of the biological activity of novel pyrimido fused acridine derivatives*. J. Serb. Chem. Soc., 2006. **71**: p. 1015-1023.
23. Lauretti F., et al., *Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels*. Journal of Virological Methods, 2003. **114**: p. 29-35.

24. Carter C.W., *The photo-oxidation of certain organic substances in the presence of fluorescent dyes*. Department of Biochemistry, University of Oxford, 1928: p. 1-8.
25. Gannon M.J. and Brown S.B., *Photodynamic therapy and its applications in gynaecology*. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, 1999. **106**: p. 1246-1254.
26. Barr H., et al., *The potential role for photodynamic therapy in the management of upper gastrointestinal disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2001. **15**: p. 311-321.
27. Krasnovsky A.A., *Primary Mechanisms of Photoactivation of Molecular Oxygen : History of Development and the Modern Status of Research*. Biochemistry, 2007. **72**: p. 1065-1080.
28. Brezinski C., *Histoires de Sciences : "Inventions, découvertes et savants"*, L'Harmattan, Editor 2006.
29. Svanberg K., et al., *Photodynamic therapy: superficial and interstitial illumination*. Journal of Biomedical Optics, 2010. **15**: p. 1-10.
30. Dougherty T.J., et al., *Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors*. Cancer Research, 1978. **38**: p. 2628-2635.
31. Luzgina V.N., Filippovich E.I., and Evstigneeva R.P., *Hematoporphyrin IX, Physicochemical properties, synthesis, biological activity and clinical use*. Khimiko-Farmatsevticheski Zhurnal, 1977. **11**: p. 26-35.
32. Phillips D. and Roberts S., eds. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy (Advanced Chemistry Texts)*. Vol. 1. 2000, Gordon and Breach Science publisher. 291.
33. Paine J.B., Chang C.K., and Dolphin D., *The synthesis of porphyrins via Dipyrromethenes*. Heterocycles, 1977. **7**.
34. Lindsey J., *The porphyrin Handbook : Synthesis and organic chemistry*, K.K. M., S.K. M., and G. R., Editors. 1999, Academic Press.
35. Teatini G.P., et al., *Hematoporphyrin uptake by experimentally induced cholesteatomas in an animal model*. Arch Otorhinolaryngol, 1989. **246**: p. 53-55.
36. Kömerik N., *A novel approach to cancer treatment: Photodynamic therapy*. Turkish Journal of Cancer, 2002. **32**: p. 83-91.
37. Figge F.H.J. and Wichterman R., *Effect of Hematoporphyrin on X-radiation sensitivity in Paramecium*. Science, 1955. **122**: p. 468-469.
38. Gregorie H.B., et al., *Hematoporphyrin-Derivative Fluorescence in Malignant Neoplasms*. Annals of Surgery, 1968. **167**.
39. Sogandares-Bernal F., Matthews J.L., and Judy M.M., *HPD-Induced reversal of chloroquine resistance of Malaria*. Mem. Inst Oswaldo Cruz, 1986. **81**: p. 241-250.
40. Ritz R., *Advances in the Biology, Imaging and Therapies for Glioblastoma*, in *Visualization and Photodynamic Therapy in Malignant Glioma - An Overview and Perspectives*, C. C., Editor 2011, In Tech. p. 424.
41. Kessel D., *Hematoporphyrin and HPD: photophysics, photochemistry and phototherapy*. Photochemistry and Photobiology, 1984. **39**(6): p. 851-859.
42. Sandersonm D. R., et al., *Hematoporphyrin as a diagnostic tool*. Cancer, 1972. **30**(1368-1372).
43. MacCormack M.A., *Photodynamic Therapy*. Advances in Dermatology, 2006. **22**: p. 219-258.
44. Granelli S.G., et al., *Photochemotherapy of Glioma Cells by Visible Light and Hematoporphyrin*. Cancer Research, 1975. **35**: p. 2567-2570.
45. Dougherty T.J., Potter W.R., and Weishaupt K.R., *Hematoporphyrin derivatives and process of preparing*, 1989, Health Research, Inc., Buffalo, N.Y.: Unites States.
46. Dougherty T.J., et al., *Photodynamic therapy*. Journal of the National Cancer Institute, 1998. **90**: p. 889-905.
47. Dougherty T.J., Gomer C.J., and Weishaupt K.R., *Energetics and Efficiency of Photoinactivation of Murine Tumor Cells Containing Hematoporphyrin*. Cancer Research, 1976. **36**: p. 2330-2333.

48. Weishaupt K.R., Gomer C.J., and Dougherty T.J., *Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic Agent in Photo-inactivation of a Murine Tumor*. *CANCER RESEARCH*, 1976. **36**: p. 2326-2329.
49. Dahlman A., et al., *Laser Photoradiation Therapy of Cancer*. *Cancer Research*, 1983. **43**: p. 430-434.
50. Berenbaum M.C., Bonnett R., and Scourides P.A., *In vivo biological activity of the components of Haematoporphyrin derivative* *Br. J. Cancer*, 1982. **45**: p. 571-581.
51. Dougherty T.J., *Variability in hematoporphyrin derivative preparations*. *Cancer Research*, 1982. **42**: p. 1188.
52. Hayata Y., et al., *Hematoporphyrin Derivative and Laser Photoradiation in the Treatment of Lung Cancer*. *Clinical Investigations*, 1982. **81**: p. 269-277.
53. Malik Z. and Lugaci H., *Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins*. *Br. J. Cancer*, 1987. **56**: p. 589-595.
54. Dougherty T.J., *Photoradiation Therapy for Cutaneous and Subcutaneous Malignancies*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1981. **77**: p. 122-124.
55. Andersson-Engels S., et al., *Tumour Marking Properties of Different Haematoporphyrins and Tetrasulfonated Phthalocyaninem - A Comparison*. *Lasers in Medical Science*, 1988: p. 115-123.
56. Moan J. and Sommer S., *Oxygen Dependence of the Photosensitizing Effect of Hematoporphyrin Derivative in NHIK 3025 Cells*. *Cancer Research*, 1985. **45**: p. 1608-1610.
57. Mironov A.F., Nizhnik A.N., and Nockel A.Y., *Hematoporphyrin derivatives: An oligomeric composition study*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1990. **4**(3): p. 297–306.
58. Ascencio M., et al., *Intérêt et place de la thérapie photodynamique en gynécologie*. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, 2007. **35**: p. 1155–1165.
59. Pathak M.A., Daniels F., and Fitzpatrick T.B., *The presently known distribution of furocoumarins (psoralen) in plants* *The Journal of Investigative Dermatology*, 1961: p. 225-239.
60. Horio T. and Okamoto H., *The mechanisms of inhibitory effect of 8-methoxypsoralen and long-wave ultraviolet light on experimental contact sensitization*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1982. **78**: p. 402-405.
61. Zarebska Z., et al., *PUVA (psoralenUVA) photochemotherapy: processes triggered in the cells*. *Il Farmaco*, 2000. **55**: p. 515–520.
62. Rodighiero G. and Dall'Acqua F., *Biochemical and Medical Aspects of Psoralens*. *Photo-chemistry and Photobiology*, 1976. **24**: p. 647-653.
63. Woo Y.-T and Lai D.Y., *Linear and angular furocoumarins : psoralens, angelicins and related compounds*, in *Carcinogenicity and structure activity relationships. Other biological properties. Metabolism. Environmental significance*, A.M. F. and A.J. C., Editors. 1896, Science applications international corporation: 8400 Westpark Drive McLean, Virginia 22102.
64. Masood Q. and Majid I., *Photochemotherapy and its variants : safe and useful modes of therapy*. *JK-Practitioner*, 2004. **3**: p. 166-170.
65. Seshadri T.R. and Venkatarao C., *A new separation of the components of Psoralea Corylifolia, Linn.?*, 1937. **?**: p. 351-356.
66. Booy O. et al., *Manuel pratique de la Berce géante*, in *Directives pour la gestion et le contrôle d'une espèce végétale invasive en Europe*, R.H.P. Nielsen C., Nentwig W., Wade M., Editor 2005, Forest and Landscape Denmark.
67. O.I., P., et al., *Extraction of Linear Furocoumarins from Ammi Majus Seeds by Means of Supercritical Fluid Extraction and Supercritical Fluid Chromatography*. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2009. **3**: p. 1165–1171.
68. Muret P., *La pharmacocinétique clinique des psoralènes utilisés en photochimiothérapie corporelle*. *La Lettre du Pharmacologue*, 2001. **15**: p. 99-103.

69. Karioti A. and Bilia A.R., *Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics*. International Journal of Molecular Sciences, 2010. **11**: p. 562-594.
70. Koren H., et al., *Hypericin in phototherapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1996. **36**: p. 113-119.
71. Agostinis P., et al., *Hypericin in cancer treatment: more light on the way*. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2002. **34**: p. 221-241.
72. Head C.S., et al., *Photodynamic therapy and tumor imaging of hypericin-treated squamous cell carcinoma*. World Journal of Surgical Oncology, 2006. **4**: p. 1-10.
73. Hadjur C. and Jardon P., *Quantitative analysis of superoxide anion radicals photosensitized by hypericin in a model membrane using the cytochrome c reduction method*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1995. **29**: p. 147-156.
74. *Role of Curcumin in Cancer Therapy*. Curr Probl Cancer, 2007. **31**: p. 243-305.
75. Paschoal M.A., et al., *Photodynamic potential of curcumin and blue LED against Streptococcus mutans in a planktonic culture*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2013. **xx**: p. xxxx-xxxx.
76. Andrade M.C., et al., *Effect of different pre-irradiation times on curcuminmediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of Candida spp.* Archives of oral biology 2013. **58**: p. 200-210.
77. Miclescu A., Basu S., and Wiklund L., *Methylene blue added to a hypertonic-hyperoncotic solution increases short-term survival in experimental cardiac arrest*. Crit Care Med., 2006. **11**.
78. Hoffmann A.A., et al., *Methylene Blue Immobilized on Cellulose Acetate with Titanium Dioxide:an Application as Sensor for Ascorbic Acid*. Chemical Society, 2008. **19**: p. 943-949.
79. Tardivo J.P., et al., *Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2005. **2**: p. 175-191.
80. Tang W., et al., *Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **369**: p. 579-583.
81. Wainwright M., *Phenothiazinium photosensitisers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenothiazinium salts*. Dyes and Pigments, 2007. **73**: p. 7-12.
82. Pelgrims J., et al., *Methylene blue in the treatment and prevention of ifosfamide-induced encephalopathy: report of 12 cases and a review of the literature*. British Journal of Cancer, 2000. **2**: p. 291-294.
83. Küpfer A., Aeschlimann C., and Cerny T., *Methylene blue and the neurotoxic mechanisms of ifosfamide encephalopathy*. Eur J Clin Pharmacol, 1996: p. 249-252.
84. Danian X. and Neckers D.C., *Aggregation of Rose Bengal molecules in solution*. Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry, 1987. **40**: p. 361-370.
85. Panzarini E., Inguscio V., and Dini L., *Overview of Cell DeathMechanisms Induced by Rose Bengal Acetate-Photodynamic Therapy*. International Journal of Photoenergy, 2011. **2011**: p. 1-11.
86. DeRosa M.C. and Crutchley R.J., *Photosensitized singlet oxygen and its applications*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. **233-234**: p. 351-371.
87. Redmond R.W. and Gamlin J. N., *A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules*. Photochemistry and Photobiology, 1999. **70**(4): p. 391-475.
88. Thompson J.F., Hersey P., and Wachter E., *Chemoablation of metastatic melanoma using intralesional Rose Bengal*. Melanoma Research, 2008. **18**: p. 405-411.
89. Danovaro R., et al., *The first metazoa living in permanently anoxic conditions*. BMC Biology, 2010. **30**: p. 1-10.

90. Jung Jang Y., et al., *Comparison of the binding modes of [Ru(2,2'-bipyridine)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> and [Ru(2,2':6',2'-terpyridine)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> to native DNA*. Bulletin of Korean Chemical Society, 2010. **31**(5): p. 1314-1318.
91. Dobrucki J.W., *Interaction of oxygen-sensitive luminescent probes Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> and Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> with animal and plant cells in vitro. Mechanism of phototoxicity and conditions for non-invasive oxygen measurements*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2001. **65**: p. 136-144.
92. Jubert C. and Bailey G., *Isolation of chlorophylls a and b from spinach by counter-current chromatography*. Journal of Chromatography A, 2007. **1140**: p. 95–100.
93. Brandis A.S., Salomon Y., and Scherz A., *Chlorophylls and bacteriochlorophylls : biochemistry, biophysics, functions and applications*, in *Advances in photosynthesis and respiration*, G. B., et al., Editors. 2006. p. 466-467.
94. *The porphyrin Handbook : Electron transfer*, A. Press, Editor 2000, Karl M. Kadish, Kevin M. Smith, Roger Guilard. p. 203.
95. Triantaphyllide C. and Havaux M., *singlet oxygen in plants : production, detoxification and signaling*. Trends in Plant Science, 2009. **14**(4): p. 1360-1385.
96. Krieger-Liszkay A., *Singlet oxygen production in photosynthesis*. Journal of Experimental Botany, 2004. **56**(411): p. 337–346.
97. Brandis A.S., Salomon Y., and Scherz A., *Chlorophyll Sensitizers in Photodynamic Therapy*, in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, G. B., et al., Editors. 2006, Springer. p. 461–483.
98. Szczygieł M., et al., *Central Metal Determines Pharmacokinetics of Chlorophyll-Derived Xenobiotics*. Journal of Medical Chemistry, 2008. **51**: p. 4412–4418.
99. Schoefs B. and Bertrand M., *The formation of chlorophyll from chlorophyllide in leaves containing proplastids is a four-step process*. Federation of European Biochemical Societies, 2000. **486**: p. 243-246.
100. Walther J., et al., *Protochlorophyllide: a new photosensitizer for the photodynamic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria*. Federation of European Microbiological Societies, Microbiol Letters, 2009. **290**: p. 156–163.
101. Bonnett R. and Martinez G., *Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy*. Tetrahedron, 2001. **57**: p. 9513-9547.
102. Li W.-T., Chang J.-C., and Hsieh N.-N., *Pheophytin a and b mediated photodynamic therapy against sensitive and multidrug-resistant breast cancer cells*. p. 130.
103. Hsu Y.-C., et al., *Topical chlorophyll-pheophytin derivative-mediated photodynamic therapy for DMBA-induced hamster buccal pouch premalignant lesions – an in vivo study*. Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XIX, 2010. **7551**: p. 1-7.
104. Garbo G.M., *Purpurins and benzochlorins as sensitizers for photodynamic therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1996. **34**: p. 109-116.
105. Drogat N., et al., *High yield preparation of purpurin-18 from Spirulina maxima*. Dyes and Pigments, 2011. **88**: p. 125e127.
106. Cun Cui B., et al., *Efficient synthesis and in vitro PDT effect of purpurin-18-N-Aminoimides*. Bulletin of Korean Chemical Society, 2010. **31**(11): p. 3313-3317.
107. Walker I., Vernon D.I., and Brown S.B., *The solid-phase conjugation of purpurin-18 with a synthetic targeting peptide*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2004. **14**: p. 441–443.
108. Pandey R.K. and Dougherty T.J., *Pyropheophorbides conjugates and their use in photodynamic therapy*, in *United States Patent 1994*, Health Research, Inc., Buffalo, N.Y.: United States of America. p. 1-65.

109. Ming-Kuen Tang P., et al., *Pheophorbide a, An Active Compound Isolated from Scutellaria barbata, Possesses Photodynamic Activities by Inducing Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma*. *Cancer Biology & Therapy*, 2006. **5**: p. 1111-1116.
110. Rapozzi V., Miculan M., and Xodo L.E., *Evidence that photoactivated pheophorbide a causes in human cancer cells a photodynamic effect involving lipid peroxidation*. *Cancer Biology & Therapy*, 2009. **8**: p. 1318-1327.
111. Hey Pun E.C., et al., *LED-activated Pheophorbide-a Induces Cellular Destruction of Ovarian Cancer Cells*. *Journal of Undergraduate Life Sciences*, 2011. **5**(1): p. 44-46.
112. Park J.-H., et al., *Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6*. *Lasers Med Sci*, 2010. **25**: p. 705-710.
113. Moon Y.-H., et al., *Efficient preparation of highly pure chlorin e6 and its photodynamic anti-cancer activity in a rat tumor model*. *Oncology Reports*, 2009. **22**: p. 1085-1091.
114. Brandis A.S., Salomon Y., and Scherz A., *Bacteriochlorophyll Sensitizers in Photodynamic Therapy*, in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, G. B., et al., Editors. 2006, Springer. p. 485–494.
115. Dougherty T.J., *Bacteriochlorophyll-A derivatives useful in photodynamic therapy*, 1992, Health Research, Inc., Buffalo, N.Y: United States of America. p. 1-10.
116. Fiedor L., et al., *Understanding chlorophylls: Central magnesium ion and phytol as structural determinants*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008. **1777**: p. 1491–1500.
117. Huang P., et al., *Photosensitizer-conjugated silica-coated gold nanoclusters for fluorescence imaging-guided photodynamic therapy*. *Biomaterials*, 2013. **xxx**: p. 1-12.
118. Matès J.M. and Sanchez-Jiménez F.M., *Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2000. **32**: p. 157-170.
119. Triantaphylide C., et al., *Singlet Oxygen Is the Major Reactive Oxygen Species Involved in Photooxidative Damage to Plants*. *Plant Physiology*, 2008. **148**: p. 960-968.
120. Bhattacharjee S., *The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants*. *Journal of Botany*, 2011. **2012**: p. 1-22.
121. Gill S.S. and Tuteja N., *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010. **48**: p. 909-930.
122. Agnez-Lima L.F., et al., *DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms*. *Mutation Research*, 2012. **751**: p. 15–28.
123. Do Nascimento G.M., et al., *Single-wall carbon nanotubes modified with organic dyes: Synthesis, characterization and potential cytotoxic effects*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2010. **211**: p. 99-107.
124. *The Porphyrin Handbook*, in *Medical aspects of porphyrins*, K.K. M., S.K. M., and G. R., Editors. 2003.
125. Stochel G., et al., *Bioinorganic Photochemistry*, Wiley, Editor 2009. p. 377.
126. Plaetzer K., et al., *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects*. *Lasers Med Sci*, 2009. **24**: p. 259–268.
127. Josefsen L.B. and Boyle R.W., *Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitizers*. *Metal-Based Drugs*, 2007. **2008**: p. 1-24.
128. Sharman W.M., Allen C.M., and Van Lier J.E., *Role of Activated Oxygen Species in Photodynamic Therapy*, in *Methods in Enzymology*, A. Press, Editor 200. p. 376-400.
129. Davies M.J., *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003. **305**: p. 761–770.
130. Wang S., et al., *Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy*. *Journal of Materials Chemistry*, 2004. **14**: p. 487-493.



131. Finlayson-Pitts B.J. and Pitts J.N., *Atmospheric Chemistry, in Fundamentals and experimental techniques*, Wiley, Editor 1986.
132. Rubin M.B., *The history of ozone. The Schönbein period, 1839-1868*. American Chemical Society, 2001. **26**: p. 40-56.
133. Greer A., *Christopher Foote's Discovery of the Role of Singlet Oxygen [ $^1\text{O}_2$  ( $^1\Delta_g$ )] in Photosensitized Oxidation Reactions* Accounts of Chemical Research, 2006. **39**: p. 797-804.
134. Khan A.U. and Kasha M., *Singlet molecular oxygen evolution upon simple acidification of aqueous hypochlorite: Application to studies on the deleterious health effects of chlorinated drinking water*. Proceeding of the National Academy Science, 1994. **91**: p. 12362-12364.
135. Khan A.U. and Kasha M., *Direct spectroscopic observation of singlet oxygen emission at 1268 nm excited by sensitizing dyes of biological interest in liquid solution*. Proceeding of the National Academy of Sciences, 1979. **76**(12): p. 6047-6049.
136. Pryor W.A., et al., *Free radical biology and medicine: it's a gas, man!* The American Physiological Society, 2006. **291**: p. 491-511.
137. Jockusch S., et al., *Singlet molecular oxygen by direct excitation*. Photochemical and Photobiological Sciences, 2008. **7**: p. 235-239.
138. Harada Y., et al., *Chemiluminescence from singlet oxygen that was detected at two wavelengths and effects of biomolecules on it*. Talanta, 2009. **77**: p. 1223-1227.
139. Kanofsky J.R. and Sima P.D., *Singlet oxygen generation from the reaction of ozone with plant leaves*. The journal of biological chemistry, 1994. **270**(14): p. 7850-7852.
140. Malik S., et al., *Singlet oxygen-mediated synthesis of malarial chemotherapeutic agents*. Medicinal Chemistry Research, 2013: p. 1-21.
141. Kochevar I.E. and Redmond R.W., *Photosensitized Production of Singlet Oxygen*. Photochemistry and Photobiology, 1992. **55**(523): p. 20-28.
142. Kuimova M.K., Yahioglu G., and Ogilby P.R., *Singlet Oxygen in a Cell: Spatially Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants*. Journal of The American Chemical Society, 2009. **131**(1): p. 332-340.
143. Guo H., et al., *Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2010. **6**: p. 486-495.
144. Markovic Z.M., et al., *In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes*. Biomaterials, 2011. **32**: p. 1121 - 1129.
145. Ferreira C.G., et al., *Apoptosis: Target of Cancer Therapy*. Clinical Cancer Research, 2002. **8**: p. 2024-2034.
146. Bandhana K., et al., *Programmed cell death and its clinical implications*. Indian Journal of Experimental Biology, 2002. **40**: p. 513-524.
147. Overholtzer M., et al., *A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion*. Cell, 2007. **131**: p. 966-979.
148. Hoa N., et al., *Molecular Mechanisms of Paraptosis Induction: Implications for a Non-Genetically Modified Tumor Vaccine*. PLoS ONE, 2009. **4**(2): p. 1-19.
149. Sperandio S., de Belle I., and Bredesen D.E., *An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(26): p. 14376-14381.
150. Kroemer G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death and Differentiation, 2009. **16**: p. 3-11.
151. Frisch S.M. and Sreaton R.A., *Anoikis mechanisms*. Current Opinion in Cell Biology, 2001. **13**: p. 555-562.
152. Gilmore A.P., *Anoikis*. Cell Death and Differentiation, 2005. **12**: p. 1473-1477.

153. Kim Y.-N., et al., *Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis*. International Journal of Cell Biology, 2011. **2012**: p. 1-11.
154. Poulin L., *Étude de la relation structure-fonction de la protéine BI-1 chez Saccharomyces cerevisiae*, in *Faculté des Sciences et de Génie* 2005, Université Laval.
155. Lawen A., *Apoptosis—an introduction*. BioEssays, 2003. **25**: p. 888–896.
156. Agostinis P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011. **61**(4): p. 250–281.
157. Lim M.E., et al., *Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles*. Biomaterials, 2012. **33**: p. 1912 - 1920.
158. Kuo W.S., et al., *Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy*. Biomaterials, 2012. **33**: p. 3270-3278.
159. Jeffes E. W., et al., *Photodynamic therapy of actinic keratoses with topical aminolevulinic acid hydrochloride and fluorescent blue light*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2001. **45**(1): p. 96-104.
160. Castano A.P., Demidov T.N., and Hamblin M.R., *Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2004. **1**: p. 279—293.
161. Nifiatis F., et al., *Substituent Effects of Porphyrin on Singlet Oxygen Generation Quantum Yields*. The Open Spectroscopy Journal, 2011. **5**: p. 1-12.
162. Hashimoto T., et al., *Theoretical Study of the Q and B Bands of Free-Base, Magnesium, and Zinc Porphyrins, and Their Derivatives*. J. Phys. Chem. A, 1999. **103**: p. 1894-1904.
163. Moss G.P., *Nomenclature of tétrapyrroles*. Pure and Applied Chemistry, 1987. **59**(6): p. 779-832.
164. Giovannetti R., *The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins*, in *Macro to Nano Spectroscopy*, J. C., Editor 2012, Uddin J. . p. 448.
165. Wijesekera T.P. and Dolphin D., *Some preparations and properties of porphyrins*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1985. **193**: p. 229-266.
166. Scheer H. and Katz J.J., *Nuclear Magnetic resonance spectroscopy of porphyrins and metalloporphyrins*, in *Porphyrins and Metalloporphyrins*, S.K. M., Editor 1975. p. 399-514.
167. Joule J.A. and Mills K., *Heterocyclic Chemistry*, in *Fifth Edition*, Wiley, Editor 2010, Blackwell Publishing Ltd. p. 720.
168. Prushan M. *Absorption and Fluorescence Spectroscopy of Tetraphenylporphyrin and Metallo-Tetraphenylporphyrin*. 2005; Available from: <http://www.lasalle.edu/~prushan/Abs%20and%20Fluor%20of%20TPPH2.pdf>.
169. Socoteanu R. et al., *Trends in Interdisciplinary Studies Revealing Porphyrinic Compounds Multivalency Towards Biomedical Application*, in *Biomedical Engineering – From Theory to Applications*, P.R. Fazel, Editor 2011, InTech. p. 486.
170. Gomes A.T.P.C., *Acid Catalysis in the Way to Porphyrins: Reaction of Pyrrole/Aldehydes in the Synthesis of meso-Substituted Porphyrins*. Revista Virtual de Química, 2013. **5**(2): p. 312-317.
171. Evstigneeva R.P., *Advances and perspectives of porphyrin synthesis*. Pure Applied Chemistry, 1981. **53**: p. 1129-1140.
172. Rothmund P., *Porphyrin Studies. III. The Structure of the Porphine Ring System*. Journal of the American Chemical Society, 1939. **61**(10): p. 2912–2915.
173. Rees R.D., *The synthesis of novel porphyrin macrocycles for their use as potential non-linear optical materials*, in *Department of Chemistry* 1999, Brunel University. p. 171.
174. Lindsey J.S., et al., *Rothmund and Adler-Longo Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins under Equilibrium Conditions*. The Journal of Organic Chemistry, 1987. **52**: p. 827-836.

175. Silva C.R. and Airoidi C., *Acid and Base Catalysts in the Hybrid Silica Sol–Gel Process*. Journal of Colloid and Interface Science, 1997. **195**: p. 381–387.
176. Rothmund P. and Menotti A.R., *Porphyrin Studies. IV. The Synthesis of  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetraphenylporphine*. Journal of the American Chemical Society, 1941. **63**(1): p. 267-270.
177. Lamarche F., *Synthèse et évaluation biologique de porphyrines-polyamines en vue de leur application en photothérapie dynamique des cancers*, in *Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles* 2004, Université de Limoge. p. 204.
178. Adler A.D., et al., *A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine*. Journal of Organic Chemistry, 1967. **32**(2): p. 476–476.
179. Little R.G., et al., *The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins*. Journal of Heterocyclic Chemistry, 1975. **12**(2): p. 343–349.
180. !!! INVALID CITATION !!!
181. Lindsey J.S., Hsu H.C., and Schreiman I.C., *Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions*. Tetrahedron Letters, 1986. **27**(41): p. 4969–4970.
182. Geier G.R., Riggs J.A., and Lindsey J.S., *Investigation of acid cocatalysis in syntheses of tetraphenylporphyrin*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2001. **5**(9): p. 681–690.
183. Leznoff C.C. and Svirskaya P.I., *The Synthesis of Unsymmetrical Tetraarylporphyrins on Solid Phases*. Angewandte Chemie International Edition in English 1978. **17**: p. 947–947.
184. Shaikh K.A., Patila V.A., and Bandgar B.P., *An efficient solvent-free synthesis of meso-substituted dipyrromethanes using  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  catalysis*. Orbital Electronical Journal of Chemistry, 2012. **4**(2): p. 111-117.
185. Sobral A.J.F.N., et al., *One-step synthesis of dipyrromethanes in water*. Tetrahedron Letters, 2003. **44**: p. 3971–3973.
186. Hong S.-J., Lee M.-H., and Lee C.-H., *meso-Substituted Dipyrromethanes from Vinylogous Aromatic Heterocycles and their utilization to the Synthesis of meso-Functionalized Porphyrins*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2004. **25**(10): p. 1545-1550.
187. Shahed Ali S., et al., *Molecular iodine- catalyzed convenient synthesis of meso substituted dipyrromethanes*. Archives of Applied Science Research, 2010. **2**(6): p. 121-125.
188. Shaikh K.A., Patil V.A., and Ahmed A., *A Novel Method for the Synthesis of Dipyrromethanes Under Solvent-Free Condition*. E-Journal of Chemistry, 2012. **9**(4): p. 1796-1800.
189. Montalban A.G., et al., *Synthesis and reactions of dipyrromethane-2,10-dicarboxylates*. Tetrahedron Letters, 2002. **43**: p. 1751–1753.
190. Karunaratne V. and Dolphin D., *Oxidation of Substituted 2-Methylpyrroles With Perhalogenated Metalloporphyrins: A One-pot Synthesis of Dipyrromethanes*. Tetrahedron Letters, 1996. **37**(5): p. 603-604.
191. Bruckner C., et al., *Novel and Improved Syntheses of 5,15-Diphenylporphyrin and its Dipyrrolic Precursors*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 1998. **2**: p. 455–465.
192. Woodward R.B., *The total synthesis of chlorophyll*. Journal of the American Chemical Society, 1964. **82**: p. 383-404.
193. Woodward R.B., *The total synthesis of chlorophyll*. Pure and Applied Chemistry 1961. **2**: p. 383–404.
194. Arsenault G.P., Bullock E., and MacDonald S.F., *Pyromethanes and porphyrins therefrom*. Journal of the American Chemical Society 1960. **82**: p. 4384–4389.
195. Lee C.-H., et al., *Synthetic Approaches to Regioisomerically Pure Porphyrins Bearing Four Different meso-Substituents*. Tetrahedron, 1995. **51**(43): p. 11645–11672.
196. Monteiro C.J.P., et al., *Photophysical properties of unsymmetric meso-substituted porphyrins synthesized via the Suzuki coupling reaction*. Tetrahedron, 2012. **68**(42): p. 8783–8788.

197. Wood et al., *Handbook of porphyrins science : NMR and EPR Techniques*, K.K. M., S.K. M., and G. R., Editors. 2010, World Scientific. p. 532.
198. Boudif A. and Momenteau M., *Synthesis of a porphyrin-2,3-diacrylic acid using a new '3 + 1' type procedure* J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1994(18): p. 2069-2070.
199. Nascimento B.F.O., d'A. Rocha Gonsalves A.M., and Pineiro M., *MnO<sub>2</sub> instead of quinones as selective oxidant of tetrapyrrolic macrocycles*. Inorganic Chemistry Communications, 2010. **13**: p. 395–398.
200. Haute Autorité de Santé. Available from: [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr).
201. Senge M.O. and Brandt J.C., *Temoporfin (Foscan, 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin) - A Second-generation Photosensitizer*. Photochemistry and Photobiology, 2011. **87**: p. 1240–1296.
202. Ajioka R.S., Phillips J.D., and Kushner J.P., *Biosynthesis of heme in mammals*. Biochimica et Biophysica Acta, 2006. **1763**: p. 723–736.
203. Mbakidi J.P., *Élaboration et caractérisation de nouvelles nanoparticules superparamagnétiques à motifs porphyriniques pour une application en photothérapie dynamique des cancers*, in *Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles* 2011, Université de Limoges. p. 224.
204. Rossetti F.C., et al., *Fluorometric quantification of protoporphyrin IX in biological skin samples from in vitro penetration/permeation studies*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. **46**(4).
205. Schmidt-Erfurth U. and Hasan T., *Mechanisms of Action of Photodynamic Therapy with Verteporfin for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration*. Survey of ophthalmology, 2000. **45**(3): p. 195-214.
206. Kumar A., et al., *Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and targeted peptides for cancer treatment*. Biomaterials, 2012. **33**: p. 1180-1189.
207. Liu Y. and Zhang N., *Gadolinium loaded nanoparticles in theranostic magnetic resonance imaging*. Biomaterials, 2012. **33**: p. 5363 - 5375.
208. Frochot C., et al., *New glycosylated porphyrins for PDT applications*. Oftalmologia, 2003. **56**(1): p. 62-66.
209. Di Stasio B., et al., *The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2005. **40**(11): p. 1111-1122.
210. Schneider R., et al., *Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005. **13**(8): p. 2799-2808.
211. Gravier J., et al., *Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and in vivo delivery studies*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **51**(13): p. 3867-3877.
212. Schneider R., et al., *Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy*. Journal of Medicinal Chemistry, 2006. **6**(5): p. 469-488.
213. Ferguson A.T., Lapidus R.G., and Davidson N.E., *The regulation of estrogen receptor expression and function in human breast cancer*. Cancer treatment and research 1998. **94**: p. 255-278.
214. Murphy L.C., et al., *The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1998. **65**(1-6): p. 175-180.
215. Swamy N., et al., *An estradiol-porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor-positive breast cancer cells*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002. **10**(10): p. 3237-3243.
216. El-Akra N., et al., *Synthesis of estradiol-pheophorbide a conjugates: evidence of nuclear targeting, DNA damage and improved photodynamic activity in human breast cancer and vascular endothelial cells*. Photochemical and Photobiological Sciences, 2006. **5**(11): p. 996-999.

217. Morosini V., *Pour une amélioration de la thérapie photodynamique appliquée à la cancérologie : potentialités des dendrimères poly(amidoamine) et des Quantum Dots CdTe adressés par l'acide folique*, in *Ecole Doctorale Biologie, Santé, Environnement* 2010, Université de Lorraine. p. 263.
218. Di Stasio B., *Etude de nouveaux photosensibilisateurs pour des applications en thérapie photodynamique*, in *Biologie Santé Environnement* 2003-2007, Université de Lorraine. p. 136.
219. Kaldapa C., et al., *Synthesis of new glycosylated neutral and cationic porphyrin dimers*. *Tetrahedron Letters*, 2000. **41**(3): p. 331-335.
220. Sol V., et al., *Synthesis, spectroscopy, and photocytotoxicity of glycosylated amino acid porphyrin derivatives as promising molecules for cancer phototherapy*. *Journal of Organic Chemistry*, 1999. **64**(12): p. 4431-4444.
221. Sol V., et al., *Glycosyl bis-porphyrin conjugates: synthesis and potential application in PDT*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006. **14**(23): p. 7745-7760.
222. Sol V., et al., *Synthesis of new glucosylated porphyrins bearing an  $\alpha$ -D-linkage*. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 2006. **25**(4): p. 345-360.
223. Lafont D., et al., *Monoglycoconjugated phthalocyanines: Effect of sugar and linkage on photodynamic activity*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2013. **xxxx**(xxxx): p. xxxx.
224. Amessou M., et al., *Retrograde Delivery of Photosensitizer (TPPp-O-B-GluOH)<sub>3</sub> Selectively Potentiates Its Photodynamic Activity*. *Bioconjugate Chemistry*, 2008. **19**(2): p. 532-538.
225. Maillard P., et al., *Glycoconjugated Tetrapyrrolic Macrocycles*. *Journal of the American Chemical Society*, 1989. **111**(25): p. 9125-9127.
226. Momenteau M., et al., *Tetrapyrrolic Glycosylated Macrocycles for an Application in PDT*. *Journal of Biomedical Optics*, 1999. **4**(3): p. 298-318.
227. Oulmi D., et al., *Glycosylated Porphyrins: Characterization of Association in Aqueous Solutions by Absorption and Fluorescence Spectroscopies and Determination of Single Oxygen Yield in Organic Media*. *Photochemistry and Photobiology*, 1998. **67**(5): p. 511-518.
228. Brevet D., et al., *Mannose-targeted Mesoporous Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy*. *The Royal Society of Chemistry*, 2009. **Supplementary Material (ESI) for Chemical Communications**: p. 1-9.
229. Gary-Bobo M., et al., *Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **423**: p. 509-515.
230. Gary-Bobo M., et al., *Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the in vitro treatment of retinoblastoma: Drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **432**(1-2): p. 99-104.
231. Laville I., et al., *Synthesis, cellular internalization and photodynamic activity of glucoconjugated derivatives of tri and tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorins*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003. **11**: p. 1643-1652.
232. Laville I., et al., *A study of the stability of tri(glucosyloxyphenyl)chlorin, a sensitizer for photodynamic therapy, in human colon tumoural cells: a liquid chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry analysis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2004. **12**: p. 3673-3682.
233. Maillard P., et al., *In vitro phototoxicity of glycoconjugated porphyrins and chlorins in colorectal adenocarcinoma (HT29) and retinoblastoma (Y79) cell lines*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2007. **4**: p. 261-268.
234. Garcia G., et al., *DNA photocleavage by porphyrin-polyamine conjugates*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009. **17**: p. 767-776.
235. Casero R.A. and Woster P.M., *Terminally alkylated polyamine analogues as chemotherapeutic agents*. *Journal of Medicinal Chemistry* 2001. **44**(1): p. 1-26.

236. Sol V., et al., *Polyamine conjugates of meso-tritylporphyrin and protoporphyrin IX: Potential agents for photodynamic therapy of cancers*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006. **14**(5): p. 1364-1377.
237. Sarrazy V., et al., *Photodynamic effects of porphyrin-polyamine conjugates in human breast cancer and keratinocyte cell lines*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2011. **103**: p. 201-206.
238. Cao Y. and Langer R., *A review of Judah Folkman's remarkable achievements in biomedicine*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(36): p. 13203-13205.
239. Weiss A., et al., *Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: The revival of a promising idea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012. **1826**(1): p. 53-70.
240. Gabhann F.M., Stefanini M.O., and Popel A.S., *Simulating Therapeutics Using Multiscale Models of the VEGF Receptor System in Cancer*, in *Modeling Tumor Vasculature: Molecular, Cellular, and Tissue Level Aspects and Implications*, J.T. L., Editor 2012. p. 37-53.
241. Fukumura D. and Jain R.K., *Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for anti-angiogenesis and normalization*. *Microvascular Research*, 2007. **74**: p. 72-84.
242. Shibuya M., *Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006. **39**(5): p. 469-478.
243. Tozer G.M. and Bicknell R., *Therapeutic targeting of the tumor vasculature*. *Seminars in Radiation Oncology*, 2004. **14**(3): p. 222-232.
244. Tozer G.M., Kanthou C., and Baguley B.C., *Disrupting tumour blood vessels*. *Nature Reviews Cancer* 2005. **5**(6): p. 423-435.
245. Thomas N., et al., *Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009. **96**: p. 101-108.
246. Boisbrun M., et al., *Design and photophysical properties of new RGD targeted tetraphenylchlorins and porphyrins*. *Tetrahedron*, 2008. **64**(16): p. 3494-3504.
247. Chaleix V., et al., *Efficient synthesis of RGD-containing cyclic peptide-porphyrin conjugates by ring-closing metathesis on solid support*. *Tetrahedron Letters*, 2004. **45**(27): p. 5295-5299.
248. Frochot C., et al., *Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity*. *Bioorganic Chemistry*, 2007. **35**(3): p. 205-220.
249. Sol V., et al., *An efficient route to dimeric porphyrineRGD peptide conjugates via olefin metathesis*. *Tetrahedron*, 2008. **64**(2): p. 364e371.
250. Loraine, T., *Ciblage de neuropiline-1, co-récepteur du VEGF, pour potentialiser l'effet anti-vasculaire de la Thérapie Photodynamique*, in *Bio ingénierie2007*, Université Henri Poincaré-Nancy I. p. 202.
251. Djordjevic S. and Driscoll P.C., *Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor*. *Drug Discovery Today*, 2013. **18**(9-10): p. 447-455.
252. Raimondi C. and Ruhrberg C., *Neuropilin signalling in vessels, neurons and tumours*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2013. **24**: p. 172- 178.
253. Thomas N., *Thérapie photodynamique ciblant la vascurisation tumorale par l'adressage du co-récepteur neuropiline-1: Vers l'élaboration de peptides biologiquement plus stables.*, in *Biologie Santé Environnement2009*, Université Henri Poincaré, Nancy I. p. 270.
254. Bagri A., Tessier-Lavigne M., and Watts R.J., *Neuropilins in tumor biology*. *Clinical Cancer Research*, 2009. **15**(6): p. 1860-1864.
255. Lee C.C., et al., *Crystal Structure of the Human Neuropilin-1 b1 Domain*. *Structure*, 2003. **11**: p. 99-108.



256. Baston-Buest D.M., et al., *Expression of the vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 at the human embryo–maternal interface*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2011. **154**: p. 151-156.
257. Tirand L., et al., *A peptide competing with VEGF<sub>165</sub> binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells*. Journal of Controlled Release, 2006. **111**: p. 153-164.
258. Tirand L., et al., *Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study*. Drug Metabolism and Disposition, 2007. **35**: p. 806–813.
259. Thomas N., et al., *Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties* Biochemical Pharmacology / Biochemistry and Pharmacology, 2010. **80**(2): p. 226-235.
260. Nombona N., et al., *Synthesis of phthalocyanine conjugates with gold nanoparticles and liposomes for photodynamic therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2012. **107**: p. 35-44.
261. Prakash S., et al., *Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**: p. 1340 - 1351.
262. Lu F., et al., *Gold nanoparticles for diagnostic sensing and therapy*. Inorganica Chimica Acta, 2012. **393**: p. 142-153.
263. Chuto G., Chaumet-Riffaud P., and et le groupe Oncologie de la Société française de médecine nucléaire et imagerie moléculaire (SFMN), *Les nanoparticules*. Médecine Nucléaire, 2010. **34**: p. 370-376.
264. Etheridge M.L., et al., *The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2013. **9**: p. 1-14.
265. Rana S., et al., *Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**: p. 200-216.
266. Siffalovic P., et al., *Smart Nanoparticles Technology*, in *Self-Assembly of Nanoparticles at Solid and Liquid Surfaces* H. A., Editor 2012. p. 576.
267. Cao G., *NANOSTRUCTURES & NANOMATERIALS, in Synthesis, Properties & Applications*, W. Scientific, Editor 2004, Imperial College Press. p. 448.
268. Nagarajan R., *Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology*, in *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization*, N. R. and H.T. A., Editors. 2008, American Chemical Society. p. 2-14.
269. Ou M., et al., *Optimization of the synthesis of nanostructured Tb<sup>3+</sup>-doped Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by in-situ luminescence following up*. 2009. **333**(2): p. 684–689.
270. Zhang X., et al., *Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes*. Biomaterials, 2009. **30**: p. 6041–6047.
271. Tripisciano C., et al., *Single-wall carbon nanotubes based anticancer drug delivery system*. Chemical Physics Letters, 2009. **478**: p. 200–205.
272. Mamaeva V., Sahlgren C., and Lindén M., *Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **xxx**: p. xxx-xxx.
273. Vargas A. and Delie F., *Potential use of biodegradable nanoparticles for the photodynamic therapy of eye diseases*. Arch Soc Esp Oftalmol., 2009. **84**(4): p. 169-171, 173-175.
274. Díaz-Moscoso A., *Soft versus hard nanoparticles in the delivery of aromatic macrocycles for photodynamic therapy of cancer*. International Journal of Medicine and Biomedical Research, 2012. **1**(1): p. 12-23.

275. Bae B.-C. and Na K., *Development of Polymeric Cargo for Delivery of Photosensitizer in Photodynamic Therapy*. International Journal of Photoenergy, 2012: p. 1-14.
276. Ding H., et al., *Nanosopic micelle delivery improves the photophysical properties and efficacy of photodynamic therapy of protoporphyrin IX*. Journal of Controlled Release, 2011. **151**: p. 271–277.
277. Nawalany K., et al., *Comparison of photodynamic efficacy of tetraarylporphyrin pegylated or encapsulated in liposomes: In vitro studies*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2009. **97**: p. 8–17.
278. Bangham A.D., Standish M.M., and Watkins J.C., *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. Journal of Molecular Biology, 1965. **13**: p. 238-252.
279. Gaurav R. and Tejal S., *Liposomal Drug Delivery System: An Overview*. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives, 2011. **2**(6): p. 1575-1580.
280. Derycke A.S.L. and de Witte P.A.M., *Liposomes for photodynamic therapy*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**: p. 17– 30.
281. Zhou L., et al., *High-efficiency loading of hypocrellin B on graphene oxide for photodynamic therapy*. Carbon, 2012. **50**: p. 5594 - 5604.
282. Ji S.-R., et al., *Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy*. Biochimica et Biophysica Acta, 2010. **1806**: p. 29 - 35.
283. Wang X., Liu Y., and Zhu D., *Aligned Carbon Nanotubes*, in *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, N.H. S., Editor 2004, American Scientific Publishers. p. 1-15.
284. Reilly R.M., *Carbon Nanotubes: Potential Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine*. NANOTECHNOLOGY IN NUCLEAR MEDICINE, 2007. **48**(7): p. 1039-1042.
285. Lu Y.-J., et al., *Dual targeted delivery of doxorubicin to cancer cells using folate-conjugated magnetic multi-walled carbon nanotubes*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **89**: p. 1 - 9.
286. Chidawanyika W. and Nyokong T., *Characterization of amine-functionalized single-walled carbon nanotube-low symmetry phthalocyanine conjugates*. Carbon, 2010. **48**: p. 2831-2838.
287. Xiao H., et al., *Photodynamic effects of chlorin e6 attached to single wall carbon nanotubes through noncovalent interactions*. Carbon, 2012. **50**: p. 1681-1689.
288. Neves L.F.F., et al., *Targeting single-walled carbon nanotubes for the treatment of breast cancer using photothermal therapy*. Nanotechnology, 2013. **24**(37): p. 1-19.
289. Chan W.C.W., et al., *Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. **13**(1): p. 40-46.
290. Juzenas P., et al., *Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**: p. 1600–1614.
291. Zrazhevskiy P. and Gao X., *Multifunctional quantum dots for personalized medicine*. Nanotoday, 2009. **4**(5): p. 414-428.
292. Morosini V., et al., *Quantum dot–folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2011. **10**(5): p. 842-851.
293. Smith A.M., et al., *Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**: p. 1226–1240.
294. Tekdas D.A., et al., *Photodynamic therapy potential of thiol-stabilized CdTe quantum dot-group 3A phthalocyanine conjugates (QD-Pc)*. Spectrochimica Acta Part A, 2012. **93**: p. 313– 320.
295. Hsu C.-Y., et al., *Bioluminescence resonance energy transfer using luciferase-immobilized quantum dots for self-illuminated photodynamic therapy*. Biomaterials, 2013. **34**: p. 1204-1212.

296. Hong R.Y., Pan T.T., and Li H.Z., *Microwave synthesis of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles used as a precursor of nanocomposites and ferrofluids*. Journal of Magnetism and Materials, 2006. **303**: p. 60-68.
297. Majd M.H., et al., *Tamoxifen loaded folic acid armed PEGylated magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy of cancer*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **106**: p. 117-125.
298. Wu W., He Q., and Jiang C., *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies*. Nanoscale Research Letters, 2008. **3**: p. 397-415.
299. Jain T.K., et al., *Magnetic nanoparticles with dual functional properties: Drug delivery and magnetic resonance imaging*. Biomaterials, 2008. **29**: p. 4012-4021.
300. Klein S., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012. **425**: p. 393-397.
301. Primo F.L., et al., *Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007. **311**: p. 354-357.
302. Lee D.J., et al., *Multifunctional poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for luminescence/magnetic resonance imaging and photodynamic therapy*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **434**: p. 257- 263.
303. Huang P., et al., *Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for in vivo simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy*. Biomaterials, 2011. **32**: p. 3447-3458.
304. Cohen Y. and Shoushan S.Y., *Magnetic nanoparticles-based diagnostics and theranostics*. Current Opinion in Biotechnology, 2013. **24**: p. 1-10.
305. Nguyen D.T., Kim D.-J., and Kim K.-S., *Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles*. Micron, 2011. **42**: p. 207-227.
306. Bisker G., et al., *Controlled release of Rituximab from gold nanoparticles for phototherapy of malignant cells*. Journal of Controlled Release, 2012. **162**: p. 303-309.
307. Zhang X.-D., et al., *Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy*. Biomaterials, 2012. **33**: p. 6408-6419.
308. Oh E., et al., *One-phase Synthesis of Water-Soluble Gold Nanoparticles with Control over Size and Surface Functionalities*. Langmuir, 2010. **26**: p. 7604-7613.
309. Liang A., et al., *The surface-plasmon-resonance effect of nanogold/silver and its analytical applications*. Trends in Analytical Chemistry, 2012. **37**: p. 32-47.
310. Khan S., et al., *Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit Candida albicans biofilm*. International Journal of Nanomedicine, 2012. **7**: p. 3245-3257.
311. Jung J., et al., *Europium-doped gadolinium sulfide nanoparticles as a dual-mode imaging agent for T1-weighted MR and photoluminescence imaging*. Biomaterials, 2012. **33**: p. 5865 - 5874.
312. Li Y. and Hong G., *Synthesis and luminescence properties of nanocrystalline Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu<sup>3+</sup> by combustion process*. Journal of Luminescence, 2007. **124**(2): p. 297-301.
313. Kim S.-Y., et al., *Investigation of the imaging characteristics of the Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu nanophosphor for high-resolution digital X-ray imaging system*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 2007. **576**(1): p. 70-74.
314. Chen D., Wang Y., and Hong M., *Lanthanide nanomaterials with photon management characteristics for photovoltaic application*. Nano Energy, 2012. **1**(1): p. 73-90.
315. Soo Y.L., et al., *X-ray excited luminescence and local structures in Tb-doped Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocrystals*. Journal of Applied Physics, 1998. **83**(10): p. 5404 - 5409

316. Yang G.-M., et al., *Down-conversion near infrared emission in Pr<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> co-doped Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> transparent ceramics*. Physica B: Condensed Matter, 2011. **406**(19): p. 3588–3591.
317. Wegh R.T., et al., *Visible quantum cutting in Eu<sup>3+</sup>-doped gadolinium fluorides via downconversion*. Journal of Luminescence, 1999. **82**: p. 93-104.
318. Meijerink A., et al., *Photon management with lanthanides*. Optical Materials, 2006. **28**: p. 575–581.
319. Adams B., et al., *Parametric down conversion of X-ray photons*. Journal of Synchrotron Radiation, 2000. **7**: p. 81-88.
320. Lechevallier S., et al., *APTES-Modified RE<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu<sup>3+</sup> Luminescent Beads: Structure and Properties*. Langmuir, 2012. **28**(8): p. 3962–3971.
321. Bazzia R., et al., *Synthesis and luminescent properties of sub-5-nm lanthanide oxides nanoparticles*. Journal of Luminescence, 2003. **102-103**: p. 445-450.
322. Morales Ramírez A. de J., et al., *Properties of Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup> nanopowders obtained by sol–gel process*. Materials Research Bulletin, 2010. **45**(1): p. 40-45.
323. Joshi C., et al., *Color tunable emission from (Gd<sub>x</sub>Y<sub>1-x</sub>)<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Er<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> phosphor prepared by combustion method*. Journal of Luminescence, 2012. **132**: p. 806-810.
324. Lin M., et al., *Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticules for biomedical applications*. Biotechnology Advances, 2012. **30**: p. 1551-1561.
325. Li L., et al., *Synthesis and upconversion luminescence of Lu<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup> nanocrystals*. Trans. Nonferrous Met. Soc. China, 2012. **22**: p. 373-379.
326. Li Y., et al., *Red and green upconversion luminescence of Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Er<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> nanoparticles*. Journal of Alloys and Compounds, 2008. **456**: p. 247–250.
327. Dai Y., et al., *Doxorubicin conjugated NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Tm<sup>3+</sup> nanoparticles for therapy and sensing of drug delivery by luminescence resonance energy transfer*. Biomaterials, 2012. **33**: p. 8704-8713.
328. Wang C., et al., *Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**: p. 6145 - 6154.
329. Stöber W., Fink A., and Bohn E., *Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range*. Journal of Colloid and Interface Science, 1968. **26**: p. 62-69.
330. Abarkan I., Doussineau T., and Smaïhi M., *Tailored macro/microstructural properties of colloidal silica nanoparticles via microemulsion preparation*. Polyhedron, 2006. **25**: p. 1763-1770.
331. Dirè S., et al., *Effect of functional groups on condensation and properties of sol-gel silica nanoparticles prepared by direct synthesis from organoalkoxysilanes*. Materials Chemistry and Physics, 2011. **126**: p. 909-917.
332. Norek M. and Peters J.A., *MRI contrast agents based on dysprosium or holmium*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2011. **59**: p. 64-82.
333. Couleaud P., *Fonctionnalisation par des peptides de nanoparticules hybrides multifonctionnelles pour la thérapie photodynamique ciblant la neuropiline-1.*, in *RP2E-Ecole Doctorale Sciences et Ingénieurs des Ressources, Procédés, Produits, Environnement* 2011, Université de Lorraine.
334. Benoist D., Tourbier-Germain S., and Tourbier Y., *Plans d'expériences: Construction et analyse* 1994: Lavoisier.
335. Goupy J., *La méthode des plans d'expériences* 1988: Dunod.
336. Goupy J., *Etude comparative de divers plans d'expériences*. Revue de Statistique Appliquée 1990. **38**(4): p. 5-44.
337. Pillet M., *Introduction aux plans d'expériences par la méthode Taguchi* 1992.
338. Goupy J., *Introduction aux plans d'expériences*. 2e édition ed 2001.

339. Morlieras J., *Fonctionnalisation de nanoparticules à base de Gadolinium à visée thérapeutique.*, in *Institut Lumière Matière, Ecole Doctorale de Chimie de Lyon* 2013, Université Claude Bernard Lyon 1.
340. Fujimoto T., et al., *Accumulation of MRI contrast agents in malignant fibrous histiocytoma for gadolinium neutron capture therapy*. Applied Radiation and Isotopes, 2009. **67**(7-8 (supplement)): p. 355-358.
341. Brinker C.J., *Hydrolysis and condensation of silicates : Effects on structure*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1988. **100**: p. 31-50.
342. Sperling R.A. and Parak W.J., *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles*. Philosophical Transactions of the Royal Society A 2010. **368**: p. 1333-1383.
343. Sherry A.D., Caravan P., and Lenkinski R.E., *A primer on gadolinium chemistry*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2009. **30**(6): p. 1240–1248.
344. Morcos S.K., *Extracellular gadolinium contrast agents: differences in stability*. European Journal of Radiology, 2008. **66**(2): p. 175-179.
345. Lombardi A., Nastri F., and Pavone V., *Peptide-Based Heme-Protein Models*. Chemical Revue, 2001. **101**(10): p. 3165–3190.
346. Arnaud P., *Chimie organique*. 17ème ed, ed. Dunod 2004. 709.
347. Merrifield R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a Tetrapeptide*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(14): p. 2149-2154.
348. B., K.E.E., *Design, photophysical, molecular affinity and in vivo stability studies of novel peptides-conjugated photosensitizer targeting neuropilin-1 for applications in vascular photodynamic therapy.*, in *Lorraine* 2012, Université Nancy I Henry Poincaré. p. 218.
349. Iwunze M.O., *The characterization of the fluorescence of l-histidine in simulated body fluid*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2007. **186**(2-3): p. 283-289.
350. Teale F.W.J. and Weber G., *Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acid*. Biochemistry, 1956. **1957**(65): p. 476-482.
351. Mignot A., et al., *A Top-Down Synthesis Route to Ultrasmall Multifunctional Gd-Based Silica Nanoparticles for Theranostic Applications*. Chemistry - A European Journal, 2013. **0000**(00): p. 0-0.
352. Salokhiddinov K.I., Byteva I.M., and Gurinovich G.P., *Lifetime of singlet oxygen in various solvents*. Journal of Applied Spectroscopy, 1981. **34**(5): p. 561-564.
353. Rima, W., et al., *Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles*. Biomaterials, 2013. **34**(1): p. 181-195.
354. Lux F., et al., *Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications*. Angewandte Chemie International Edition in English, 2011. **50**(51): p. 12299-12303.
355. Senge G.-I., Badra N., and Shim Y. K., *Synthesis and Biological Evaluation of New Imidazolium and Piperazinium Salts of Pyropheophorbide-a for Photodynamic Cancer Therapy*. Int. J. Mol. Sci., 2008. **9**: p. 1407-1415.
356. Selvin P.R. and Hearst J.E., *Luminescence energy transfer using a terbium chelate: Improvements on fluorescence energy transfer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**: p. 10024-10028.
357. Selvin P.R., *Lanthanide-Based Resonance Energy Transfer*. IEEE journal of selected topics in quantum electronics, 1996. **2**(4): p. 1077-1087.
358. Casanova D., et al., *Single Lanthanide-doped Oxide Nanoparticles as Donors in Fluorescence Resonance Energy Transfer Experiments*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(39): p. 19264-19270.

359. Zheng K., et al., *Infrared to ultraviolet upconversion fluorescence of Ga<sup>3+</sup> in β-NaYF<sub>4</sub> microcrystals induced by 1560 nm excitation*. *Optical Materials*, 2011. **33**: p. 783-787.
360. Birowosuto D., et al., *PrBr<sub>3</sub>: Ce<sup>3+</sup>: A New Fast Lanthanide Trihalide Scintillator*. *IEEE Transactions on nuclear science*, 2006. **53**(5): p. 3028-3030.
361. Guillot-Noël O., et al., *Optical and scintillation properties of cerium-doped LaCl<sub>3</sub>, LuBr<sub>3</sub> and LuCl<sub>3</sub>*. *Journal of Luminescence*, 1999. **85**: p. 21-35.
362. Milbrath B.D., et al., *Radiation detector materials: An overview*. *Journal of Materials Research*, 2008. **23**(10): p. 2561-2581.
363. Pidol L., *Scintillateurs denses et rapides pour la détection de rayonnement gamma : Monocristaux à base de silicates de lutécium dopés Ce<sup>3+</sup>* in *Chimie Inorganique Paris VI2004*, Université Pierre et Marie Curie. p. 199.
364. Najahi E., *Dérivés de 2(1H)-pyrimidinones et d'isatogènes: synthèse, application de la chimie clic et activités biologiques*, in *Chimie-Biologie-Santé2011*, Université de Toulouse. p. 112.
365. Colombeau L., et al., *Synthesis of Zinc 5-(4-propargylamidocarboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin*. *trends in organic chemistry*, 2011. **15**: p. 33-40.
366. Tissandier, C., et al., *One-Pot Synthesis of Hybrid Multifunctional Silica Nanoparticles with Tunable Coating by Click Chemistry in Reverse W/O Microemulsion*. *Langmuir*, 2012. **28**(1): p. 209-218.
367. Byegard J., Skarnemark G., and Skälberg M., *The stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 1999. **241**(2): p. 281-290.
368. C., S., D. R., and D.S.J. J., *The stability of the metal complexes of cyclic tetra-aza tetra-acetic acids*. *Talanta*, 1992. **39**(3): p. 249-254.
369. Visentin S., et al., *Microwave-assisted Maillard reactions for the preparation of advanced glycation end products (AGEs)*. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2010. **8**: p. 2473-2477.
370. Wilkinson F., Helman W.P., and Ross A.B., *Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution*. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 1993. **22**(1): p. 113-262.
371. Finikova O.S., et al., *Energy and Electron Transfer in Enhanced Two-Photon-Absorbing Systems with Triplet Cores*. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2007. **111**(30): p. 6977-6990.
372. Seybold P.G. and Gouterman M., *Porphyrins XIII: Fluorescence spectra and quantum yields*. *Journal of Molecular Spectroscopy*, 1969. **31**(1): p. 1-13.







## Résumé

**Mots clés:** ATWLPPR, DOTA, DTPA, Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, glioblastome, IRM, MDA-MB-231, nanoparticules multifonctionnelles, néovaisseaux, neuropiline 1, NRP-1, PDT, oxygène singulet, photosensibilisateurs, polysiloxane, U87

La thérapie photodynamique (PDT pour Photodynamic Therapy) met en jeu des molécules nommées photosensibilisateurs (PS), de l'oxygène et de la lumière. Les PS, non cytotoxiques à l'obscurité, produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) lorsqu'ils sont excités avec une longueur d'onde appropriée en présence d'oxygène. Les ROS regroupent les radicaux de l'oxygène et l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), qui est la principale forme de ROS formés lors du processus de PDT. En présence de tissus vivants, l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> va conduire à la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. Pour améliorer l'efficacité photodynamique, une des pistes étudiées par la communauté scientifique consiste à améliorer la sélectivité du traitement. Le traitement des tumeurs primaires malignes du cerveau, dont le glioblastome multiforme (GBM ou astrocytome de grade IV) est la forme la plus agressive, reste un challenge. Lorsqu'elle est possible, la chirurgie occupe une place prépondérante. L'exérèse ne concerne que la partie volumineuse centrale de la tumeur, tandis que la zone périphérique infiltrante est, quant à elle ciblée par des traitements supplémentaires. Malgré les progrès de la neurochirurgie et de la radiothérapie, l'espérance de vie à 5 ans ne dépasse pas 10%. La thérapie photodynamique se présente comme une alternative thérapeutique grâce aux améliorations apportées par le contrôle local.

Pour traiter le glioblastome par PDT, une première approche a consisté à coupler un peptide, à un photosensibilisateur (la chlorine) *via* un bras espaceur Ahx (acide aminohexanoïque). Le peptide utilisé (ATWLPPR) est un ligand spécifique du récepteur neuropiline 1 (NRP-1). NRP-1 est lui-même un co-récepteur au récepteur du facteur vasculaire de croissance endothéliale (VEGFR) qui est surexprimé au niveau des néovaisseaux et qui favorise la néoangiogenèse au cours du développement des tumeurs solides. L'assemblage PS-Ahx-ATWLPPR a montré une stabilité peptidique *in vivo* et *in vitro* avec une bonne pharmacocinétique et une bonne biodistribution. Ses efficacités anti-tumorales et anti-vasculaires ont notamment été prouvées. Cependant, *in vivo*, le peptide ATWLPPR montrait une dégradation par le système réticulo-endothélial et l'assemblage présentait une affinité moindre pour NRP-1 par rapport au peptide seul. Afin de résoudre ces problèmes, une nouvelle stratégie décrite dans cette thèse a consisté à développer des nanoparticules multifonctionnelles. Ces nanoparticules sont constituées d'un cœur d'oxyde de gadolinium (Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) pour permettant un réhaussement de contraste positif en IRM, enrobé d'une couche de polysiloxane biocompatible dans laquelle est greffé le photosensibilisateur par liaison amide. La nanoparticule est ensuite fonctionnalisée en surface avec des agents chélatants (DOTA, DTPA) par l'intermédiaire de fonctions amines libres de la couche de polysiloxane. Les peptides de type ATWLPPR sont greffés sur les agents chélatants, ce qui permet un ciblage spécifique de NRP-1. De cette façon, on obtient des nanoparticules qui offrent à la fois une possibilité de ciblage actif des néovaisseaux tumoraux, de visualisation par IRM et un effet PDT.

Dans l'objectif d'obtenir un effet PDT optimal, une augmentation du contraste en imagerie IRM et une sélectivité maximale pour les cellules endothéliales, un plan d'expérience a été élaboré. Chaque lot du plan d'expérience a été synthétisé en faisant varier la composition chimique du cœur, l'épaisseur de la couche de polysiloxane, le nombre de photosensibilisateurs, le type de surfactant, le nombre et le type de peptides. Une fois la synthèse et la purification de ces nanoparticules effectuées, chaque lot a été caractérisé pour vérifier la conservation des propriétés photophysiques, en particulier la formation d'oxygène singulet. Des études biologiques sur des cellules tumorales de type MDA-MB-231 et U87 ont été réalisées, pour étudier la cytotoxicité, la phototoxicité et le réhaussement de contraste IRM de ces nanoparticules.

## **Abstract**

**Key words:** ATWLPPR, DOTA, DTPA, Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, glioblastoma, IRM, MDA-MB-231, multifunctional nanoparticles, neovessels, neuropilin 1, NRP-1, PDT, photosensitizer, polysiloxane, singlet oxygen, U87

Photodynamic therapy (PDT) involves molecules called photosensitizers (PS), molecular oxygen and light. PS are non-cytotoxic in the dark but produce reactive oxygen species (ROS) when they are excited with light of an appropriate wavelength in the presence of oxygen. ROS include oxygen radicals and singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), which is the main form of ROS formed during PDT processes. In the presence of living tissue, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> leads to cell death by apoptosis or necrosis. To improve photodynamic efficiency, a strategy developed by scientists consists in improving the selectivity of the treatment. The treatment of primary malignant brain tumors, including glioblastoma multiforme (GBM or astrocytoma level IV) which is the most aggressive form, remains a challenge. When it is possible, surgery is performed by removing the central volume of the tumor, while infiltrating peripheral zone is treated by additional treatments. Despite advances in neurosurgery and radiotherapy, the life expectancy at 5 years after the tumor detection does not exceed 10 %. PDT appears as an alternative treatment.

In preliminary study a photosensitizer (chlorin) coupled to a peptide (ATWLPPR) through an Ahx linker (aminohexanoic acid) has been designed. The peptide is a specific ligand of neuropilin-1 receptor (NRP-1). NRP-1 is a co-receptor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) overexpressed in neovessels and which promotes the formation of new vessels during the development of solid tumors. This targeted photosensitizer presented a peptidic stability *in vivo* and *in vitro* with good pharmacokinetic and biodistribution. Its anti-tumor and anti-vascular efficiencies have been proven. However, the ATWLPPR peptide showed degradation in the reticuloendothelial system (RES) and a reduced affinity for NRP-1 compared with peptide alone. To solve these problems, a new strategy using multifunctional nanoparticles has been developed in this thesis. The nanoparticles consist of a core of gadolinium oxide (Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) for MRI contrast, coated with a layer of biocompatible polysiloxane wherein the photosensitizer is covalently grafted. The nanoparticle surface is functionalized by chelating agents (DOTA, DTPA) *via* free amine functions of the polysiloxane layer. ATWLPPR peptides are grafted on chelating agents, which allows specific targeting of NRP-1. Nanoparticles allow a MRI visualization, a PDT effect and an active targeting of the tumor neovasculature. With the aim to obtain an optimal PDT effect, an enhancement of contrast in MRI imaging and a high selectivity for endothelial cells, an experimental design has been developed. Each batch of the experimental design was synthesized with various chemical compositions of the core, the size of the polysiloxane layer, the number of photosensitizers, the number and the type of peptides and the type of surfactant. Once the synthesis and purification of these nanoparticles done, each batch was characterized to ensure the conservation of the photophysical properties, in particular the formation of the singlet oxygen. Biological studies on tumor cell type MDA- MB-231 and U87 were carried out, especially their cytotoxicity and phototoxicity.